



Prof. univ. dr. Mihai Chiriță

www.biomateriale.ro

Specialități: Biomateriale organice naturale și
biocompozite Fenomene de transfer în
sisteme biologice, Biomimetica și Bio-TRUY

Facultatea de Biinginerie Medicală
Universitatea de Medicină și Farmacie „Grigore T. Popa”
Iasi, România



Prof. univ. dr. doc. Gheorghe Chiriță

Specialități: Chimia și Tehnologia pielor și bălșurilor,
Chimia pielii, Chimia Colagenului

Părintele disciplinei de Chimia colagenului în România,
autor și coautor a multor cărți și tratate de specialitate
Președinte pe viață al S.R.T.C.I.P.

Abundența în structuri complexe macromoleculare și supramoleculare a
lumei, vii oferă adevărate lecții de structurare ierarhizată și de eficiență
funcțională. Compoziția chimică, reactivitatea in vivo a componentelor,
forma, dimensiunile, orientările angulare și organizarea de ansamblu a
biocompozitelor, pot sugera noi concepte de materiale cu diverse aplicații.

Ingineri, biingineri, designeri și arhitecți privesc adesea către natură
pentru a descifra și prelua din ideile testate de mil de ani în bioferă, sisteme
uluitoare și de o mare diversitate, surse de inspirație pentru noi dispozitive și
sisteme tehnice și biomedicale.

Prezentul tratat despre biomolecule însumează cunoștințele și
experiența în domeniu a două generații de specialiști, rodul a peste 65
de ani de activitate în cariere didactice universitare și de cercetare
științifică.

ISBN 978-606-544-390-7
ISBN Volumul I 978-606-544-391-4



Gheorghe Chiriță

Mihai Chiriță

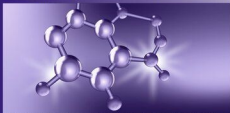
★ TRATAT de BIOMOLECULE

Mihai Chiriță Gheorghe Chiriță

TRATAT de BIOMOLECULE

Ediția a II-a

Volumul I



Editura „Gr. T. Popa”, I.U.M.F. Iași,
2016

Mihai Chiriță

Gheorghe Chiriță

TRATAT DE BIOMOLECULE

EDIȚIA a II-a

VOLUMUL 3

Descrierea CIP a Bibliotecii Naționale a României

Chiriță, Mihai

Tratat de biomolecule / Chiriță Mihai. - Ed. a 2-a. - Iași : Editura Gr.T. Popa, 2016-

4 vol.

ISBN 978-606-544-390-7

Vol. 3 / Mihai Chiriță, Gheorghe Chiriță. - 2018. - Conține bibliografie. - ISBN 978-606-544-536-9

I. Chiriță, Gheorghe

577.2

Referenți științifici:

Prof. univ. dr. Ion Poeată

Universitatea de Medicină și Farmacie „Grigore T. Popa” Iași
Facultatea de Medicină

Prof. univ. dr. ing. Anca Galaction

Universitatea de Medicină și Farmacie „Grigore T. Popa” Iași,
Facultatea de Bioinginerie Medicală

Coperta: Marius Atanasiu

Tehnoredactare computerizată și corectură: Mihai Chiriță

Editura „Gr. T. Popa”

Universitatea de Medicină și Farmacie Iași
Str. Universității nr. 16

Editura „Gr. T. Popa” este acreditată de CNCIS - Consiliul Național al Cercetării Științifice din Învățământul Superior

Toate drepturile asupra acestei lucrări aparțin autorului. Nici o parte din acest volum nu poate fi copiată sau transmisă prin nici un mijloc, electronic sau mecanic, inclusiv fotocopiare, fără permisiunea scrisă din partea autorului.

Tiparul executat la Tipografia Universității de Medicină și Farmacie “Gr. T. Popa” Iași
str. Universității nr. 16, cod. 700115, Tel. 0232 301678

Prof.univ.dr.doc.ing.Gheorghe Chiriță s-a născut la Bacău în 22.09.1926.

A absolvit în anul 1951 cursurile Facultății de Chimie Industrială a Universității Tehnice din Iași, unde și-a desfășurat ulterior întreaga carieră.

A fost numit asistent universitar în anul 1951, a devenit doctor inginer în anul 1957, profesor universitar în anul 1965, doctor docent și conducător științific de doctorat în anul 1971. Sub îndrumarea sa, au obținut titlul de doctor 10 doctoranzi în domeniul chimiei colagenului și tehnologiei pieilor și blănușilor.

A îndeplinit mulți ani funcția de șef de catedră și a ocupat funcții administrative de prodecan și apoi de prorector, în două legislaturi consecutive (1976-1984). A elaborat și tipărit 9 cărți la editurile: Ed. Didactică și Pedagogică și Edi Tehnică București, Ed.Gh.Asachi Iași, în domeniile: tehnologia pieilor, pielea animală și chimia colagenului. A obținut 20 de brevete de invenție și a publicat, în reviste din țară și din străinătate, peste 160 de lucrări științifice.

În anul 1970 a fost profesor invitat în S.U.A. unde a conferențiat în domeniul chimiei colagenului în universități din 7 capitale statale.

În anul 1991, a înființat Societatea Română a Chimistilor din Industria de Pielărie, pe care a asociat-o la Uniunea Internațională a Societăților Chimistilor din Industria de Pielărie, a cărui președinte onorific a fost.

S-a stins din viață în data de 19.09.2011 la vârsta de 85 de ani.

Prof.univ.dr.ing.Mihai Chiriță s-a născut la Iași în 26.03.1955

A absolvit cursurile Facultății de Chimie Industrială a Universității Tehnice din Iași, în anul 1980, obținând titlul de doctor inginer în anul 1993.

A urcat toate treptele ierarhiei universitare, în anul 2003 devenind primul profesor universitar din România în specialitatea de biomateriale, la Facultatea de Bioinginerie Medicală, Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr.T.Popa” din Iași. Este titular al cursurilor de: Biomateriale organice naturale, Fenomene de transfer în bioinginerie, Bioateriale speciale și tehnologii biomimetice, Biomateriale și sisteme de eliberare controlată a principiilor bioactive, Substituenți sanguini etc.

În paralel, în baza brevetelor proprii de invenție, a avut o bogată activitate în unități de producție și de cercetare, ocupând succesiv toate pozițiile necesare pentru ca o idee să devină un produs finit: brevetare, testare, marketing, reprezentant tehnic, director de vânzări, director de cercetare & dezvoltare, director tehnic în societăți cu profil chimic, expert tehnic, consilier și reprezentant al unor firme străine în România. Din anul 2003, s-a implicat constant în înțelegerea și aplicarea biomimeticii în bioingineria medicală. A fost numit membru fondator și reprezentant al României în International Society of Bionic Engineering și membru al comitetului editorial al revistei Journal of Bionics Engineering. A elaborat și tipărit, ca autor, coautor sau editor, 17 volume și 2 capitole de carte în domeniul său de specialitate, peste 100 de lucrări științifice, 39 de brevete și cereri de brevet de invenție dintre care 12 au fost aplicate în practică și în 5 mărci de produs.

www.biomateriale.ro

CUPRINS

Volumul 3

PARTEA a V-a

PROTEINE FIBROASE

12. COLAGENUL	857
12.1. Introducere	859
12.2. Biosinteza colagenului	865
12.2.1. Faza intracelulară	865
12.2.2. Faza extracelulară	873
12.3. Compoziția și structura colagenului	877
12.3.1. Compoziția în aminoacizi	877
12.3.2. Tipuri de collagen	884
12.3.3. Structura primară	893
12.3.3.1. Studiul secvenței aminoacizilor din lanțurile α -polipeptidice	895
12.3.4. Structura secundară	906
12.3.5. Structura terțiară	910
12.3.6. Structura cuaternară	917
12.4. Proprietățile fizico-chimice ale colagenului	930
12.4.1. Caracterul coloidal al colagenului	930
12.4.2. Teoria echilibrului de membrană Donnan	931

12.4.3.	Absorbția vaporilor de apă de către collagen	937
12.4.4.	Mecanismul adsorbției apei de către piele	941
12.4.5.	Interacțiunea collagenului cu acizii și bazele	944
12.4.5.1.	pH-ul izoelectric al collagenului	945
12.4.5.2.	Interacțiunea collagenului cu acizii	947
12.4.5.3.	Interacțiunea collagenului cu alcaliile	950
12.4.5.4.	Modificările produse de acizi și alcalii asupra collagenului	951
12.4.6.	Influența sărurilor neutre asupra collagenului	954
12.4.7.	Influența oxidanților asupra collagenului	956
12.4.8.	Umflarea collagenului	958
12.4.8.1.	Umflarea osmotică	960
12.4.8.2.	Umflarea liotropă	964
12.4.9.	Tranziția helix-ghem	976
12.4.10.	Collagenul compus semicristalin	979
12.4.11.	Transformările termice ale collagenului	983
12.5.	Denaturarea și renaturarea collagenului	991
12.6.	Enzime care produc degradarea collagenului	993
12.6.1.	Colagenaze animale	993
12.6.2.	Colagenaze bacteriene	994
12.7.	Hidroliza collagenului	995
12.8.	Conversia collagenului în gelatină	997
12.9.	Modificări chimice ale collagenului	1004
12.10.	Solubilizarea collagenului	1014
12.10.1.	Solubilizarea collagenului în soluții de săruri neutre	1017
12.10.2.	Solubilizarea collagenului în mediu acid	1020
12.10.3.	Solubilizarea collagenului insolubil	1021
12.11.	Reconstituirea collagenului din soluție	1029
12.12.	Geluri. Paste, Hidrolizate	1035
12.12.1.	Geluri	1035
12.12.2.	Paste	1037
12.12.3.	Hidrolizate	1038
12.13.	Efectele radiațiilor asupra collagenului	1039
12.13.1.	Introducere	1039
12.13.2.	Efectele radiațiilor ionizante asupra collagenului	1043
12.13.3.	Efectele radiațiilor ultraviolete asupra collagenului	1045
12.14.	Elemente de patogeneză ale collagenului	1050
12.15.	Îmbătrânirea collagenului	1052
12.15.1.	Considerații generale	1052

12.15.2.	Modificări ale collagenului în procesul de îmbătrânire	1054
12.15.3.	Aspecte privind îmbătrânirea pielii	1057
12.16.	Utilizări ale materialelor collagenice	1058
12.16.1.	Introducere	1058
12.16.2.	Generalități privind prelucrarea pieilor	1062
12.16.2.1.	Pielea animală	1063
12.16.2.2.	Conservarea pieilor. Operațiile preliminare și de tăbăcire	1067
12.16.3.	Materiale collagenice	1081
12.16.3.1.	Biomateriale collagenice	1082
12.16.3.2.	Materiale alimentare	1090
12.16.3.3.	Materiale auxiliare pentru prelucrarea pieilor	1095
12.16.3.4.	Utilizări diverse	1096
12.17.	Fibrele reticulare sau reticulina	1102

Bibliografie**1103****13. ELASTINA****1123**

13.1.	Introducere	1124
13.2.	Caracteristici histologice ale țesutului elastic	1125
13.3.	Chimia și biochimia elastinei	1127
13.4.	Biofizica elastinei	1135
13.5.	Proprietățile fizice și chimice ale elastinei	1136
13.6.	Elastazele și acțiunea lor asupra elastinei	1138
13.7.	Reticulările dintre elastină și collagen	1139
13.8.	Implicațiile elastinei în procesul de îmbătrânire	1144
13.9.	Elastina ca biomaterial	1146
13.9.1.	Biomateriale derivate de la elastine naturale	1148
13.9.1.1.	Țesuturi decelularizate care conțin elastină	1148
13.9.1.2.	Purificarea elastinei	1150
13.9.1.3.	Elastina hidrolizată	1154
13.9.2.	Biomateriale derivate de la elastine biosintetice	1155
13.9.2.1.	Tropoelastina biosintetică	1155
13.9.2.2.	Fragmente de tropoelastină	1156
13.9.2.3.	Polimeri asemenea elastinei	1156
13.9.2.4.	Hibridi ai elastinei cu alte molecule	1157
13.10.	Aplicațiile elastinei la biomateriale	1159

13.10.1.	Pielea	1159
13.10.2.	Construcții vasculare	1159
13.10.3.	Autoasamblarea materialelor	1160
13.11.	Rezilina și abductina	1161

Bibliografie 1163

14. KERATINA 1173

14.1.	Introducere	1174
14.2.	Epidermul	1176
14.3.	Părul	1180
14.3.1.	Constituția firului de păr	1181
14.3.1.1.	Măduva	1182
14.3.1.2.	Scoarța sau stratul cortical	1182
14.3.1.3.	Cuticula	1185
14.3.1.4.	Foliculul pilos	1186
14.3.1.5.	Mușchiul erector	1188
14.3.1.6.	Forma și culoarea părului	1188
14.4.	Keratinizarea	1192
14.5.	Structura chimică a keratinelor, compoziția în aminoacizi din fibre și componenții lor morfologici	1198
14.6.	Stadiile de organizare ale keratinelor din păr	1200
14.6.1.	Structura α -keratinei	1203
14.6.2.	Structura β -keratinei	1206
14.6.3.	Structura γ -keratinei	1207
14.7.	Proprietățile fizico-chimice ale keratinelor	1208
14.7.1.	Acțiunea acizilor și bazelor asupra keratinelor	1208
14.7.2.	Reducerea și oxidarea keratinelor	1210
14.8.	Solubilizarea și reconstituirea keratinelor	1212
14.9.	Pana	1216

Bibliografie 1222

15. MĂTASEA DE PĂIANJEN 1227

15.1.	Introducere	1227
15.2.	Păianjenul	1228
15.3.	Firul și pânza de păianjen	1232
15.4.	Mătasea de păianjen	1238
15.5.	Structura și proprietățile firului de mătase dragline	1242
15.6.	Posibilități de utilizare a firelor de mătase de păianjen	1252

Bibliografie 1253

16. MĂTASEA DE VIERMI DE MĂTASE 1257

16.1.	Noțiuni generale de sericicultură	1257
16.2.	Compoziția chimică a mătăsii	1260
16.3.	Structura mătăsii	1265
16.4.	Proprietățile mecanice ale mătăsii	1270
16.5.	Proprietățile fizice ale mătăsii	1272
16.6.	Proprietățile chimice ale mătăsii	1273
16.7.	Sericina	1279
16.8.	Producția de mătase	1281
16.9.	Utilizări ale mătăsii	1283
16.9.1.	Aplicații biomedicale ale mătăsii	1283

Bibliografie 1287

17. MĂTASEA DE MARE 1293

17.1.	Introducere	1293
17.2.	Structura mătăsii de mare	1295

Bibliografie 1297

Index alfabetic 1299

CAPITOLUL 12**COLAGENUL**

12.1.	Introducere	859
12.2.	Biosinteza colagenului	865
12.2.1.	Faza intracelulară	865
12.2.2.	Faza extracelulară	873
12.3.	Compoziția și structura colagenului	877
12.3.1.	Compoziția în aminoacizi	877
12.3.2.	Tipuri de colagen	884
12.3.3.	Structura primară	893
12.3.3.1.	Studiul secvenței aminoacizilor din lanțurile α -polipeptidice	895
12.3.4.	Structura secundară	906
12.3.5.	Structura terțiară	910
12.3.6.	Structura cuaternară	917
12.4.	Proprietățile fizico-chimice ale colagenului	930
12.4.1.	Caracterul coloidal al colagenului	930
12.4.2.	Teoria echilibrului de membrană Donnan	931
12.4.3.	Absorbția vaporilor de apă de către colagen	937
12.4.4.	Mecanismul adsorbției apei de către piele	941
12.4.5.	Interacțiunea colagenului cu acizii și bazele	944
12.4.5.1.	pH-ul izoelectric al colagenului	945
12.4.5.2.	Interacțiunea colagenului cu acizii	947
12.4.5.3.	Interacțiunea colagenului cu alcaliile	950
12.4.5.4.	Modificările produse de acizi și alcalii asupra colagenului	951
12.4.6.	Influența sărurilor neutre asupra colagenului	954
12.4.7.	Influența oxidanților asupra colagenului	956
12.4.8.	Umflarea colagenului	958
12.4.8.1.	Umflarea osmotică	960
12.4.8.2.	Umflarea liotropă	964
12.4.9.	Tranziția helix-ghem	976
12.4.10.	Colagenul compus semicristalin	979
12.4.11.	Transformările termice ale colagenului	983

12.5.	Denaturarea și renaturarea colagenului	991
12.6.	Enzime care produc degradarea colagenului	993
12.6.1.	Colagenazele animale	993
12.6.2.	Colagenazele bacteriene	994
12.7.	Hidroliza colagenului	995
12.8.	Conversia colagenului în gelatină	997
12.9.	Modificări chimice ale colagenului	1004
12.10.	Solubilizarea colagenului	1014
12.10.1.	Solubilizarea colagenului în soluții de săruri neutre	1017
12.10.2.	Solubilizarea colagenului în mediu acid	1020
12.10.3.	Solubilizarea colagenului insolubil	1021
12.11.	Reconstituirea colagenului din soluție	1029
12.12.	Geluri. Paste, Hidrolizate	1035
12.12.1.	Geluri	1035
12.12.2.	Paste	1037
12.12.3.	Hidrolizate	1038
12.13.	Efectele radiațiilor asupra colagenului	1039
12.13.1.	Introducere	1039
12.13.2.	Efectele radiațiilor ionizante asupra colagenului	1043
12.13.3.	Efectele radiațiilor ultraviolete asupra colagenului	1045
12.14.	Elemente de patogeneză ale colagenului	1050
12.15.	Îmbătrânirea colagenului	1052
12.15.1.	Considerații generale	1052
12.15.2.	Modificări ale colagenului în procesul de îmbătrânire	1054
12.15.3.	Aspecte privind îmbătrânirea pielii	1057
12.16.	Utilizări ale materialelor colagenice	1058
12.16.1.	Introducere	1058
12.16.2.	Generalități privind prelucrarea pieilor	1062
12.16.2.1.	Pielea animală	1063
12.16.2.2.	Conservarea pieilor.	
	Operațiile preliminare și de tăbăcire	1067
12.16.3.	Materiale colagenice	1081
12.16.3.1.	Biomateriale colagenice	1082
12.16.3.2.	Materiale alimentare	1090
12.16.3.3.	Materiale auxiliare pentru prelucrarea pieilor	1095
12.16.3.4.	Utilizări diverse	1096
12.17.	Fibrele reticulare sau reticulina	1102

Bibliografie

1103

12.1. INTRODUCERE

Familia colagenelor cuprinde multe specii moleculare, alcătuite din câte trei catene α -polipeptidice cu morfologie helicoidală, cu compoziții identice sau diferite, care, agregate unidirecțional și/sau lateral, dau naștere unor structuri ierarhizate de ordin superior. Colagenele sunt scleroproteine.

Generic vorbind, colagenul reprezintă în jur de 5% din greutatea organismului și 25–35% din cantitatea totală de proteine, caracterizându-se printr-o serie de specificități: compoziția în aminoacizi, secvența aminoacizilor în lanțurile polipeptidice, aspectul difracției cu raze X, periodicitatea observată la microscopul electronic, reactivitatea histochimică.

Colagenul este una dintre proteinele cu structură fibroasă ale cărei funcții sunt total diferite de acelea ale proteinelor globulare.

Fibrele, fasciculele de fibre colagenice, componenta majoră a matrixului extracelular, constituie suportul celor mai multe țesuturi conjunctive, dar se găsesc și în alte țesuturi. Colagenul se găsește în matricea extracelulară și, de asemenea, în unele celule.

Definirea moleculei de collagen nativ poate fi dată prin difracția cu raze X, cu unghi mare, la 2,8–2,9 Å și periodicitatea ecuatorială la 11 Å sau mai mult, în funcție de hidratare sau de anumite reacții specifice cu molecule mici [1].

În moleculele de collagen și de elastină se disting două zone: o zonă cu structură "ordonată", numită "cristalină" și o altă zonă cu o structură "dezordonată", numită "amorfă".

Zona ordonată este constituită, în primul rând, din glicină, alanină, prolină, hidroxiprolină, legăturile de hidrogen se repetă periodic la intervale regulate de-a lungul lanțului.

Zona dezordonată este constituită, în primul rând, din aminoacizi cu resturi laterale voluminoase și cu polarități diferite. Ea reprezintă cam 1/3 din molecula proteică [2].

În collagen și elastină nu s-au pus în evidență aminoacizii cisteină și cistină și deci, se poate conchide absența, în aceste proteine, a legăturilor disulfidice între lanțurile polipeptidice.

Colagenul conține mult mai multă hidroxiprolină și hidroxilizină decât elastina. Aminoacizii dicarboxilici (acidul glutamic și acidul asparagic) și amino-acizii bibazici (lizina și arginina) sunt mult mai numeroși în colagen decât în elastină.

În elastină se găsesc, cu preponderență, lanțuri lungi de aminoacizi alifatici și, în special, valină și leucină.

Toate țesuturile conjunctive din diferitele organe ale corpului animal conțin colagen. Cantitatea de colagen este dependentă de felul țesutului, vârstă, rasa animalului etc.

Organele, care au funcție predominant de susținere, sunt bogate în colagen, iar cele puternic regenerative sunt sărace în această componentă. Așa de pildă, ficatul, splina, rinichii, prezintă conținuturi de colagen mai mici de 2%, oasele și pereții vasculari până la 20%, iar pielea, tendoanele și cartilajele, 30–40%, raportat la greutatea crudă a organelor.

Țesutul conjunctiv are, în primul rând, misiunea de suport și de a înlesni o anumită mobilitate a diverselor organe. Țesutul conjunctiv are importanță deosebită pentru metabolismul apei și al electroliților. Acesta conține aproape toată apa extravasculară și extracelulară. Aceasta reprezintă circa 1/3 din greutatea corpului și în jur de 75% din greutatea țesutului conjunctiv [3].

Importanța tehnică a colagenului (I, II, III, IV) este deosebită fiind utilizat la fabricarea a numeroase produse în industria chimică, de pielărie, alimentară, farmaceutică, are utilizări în medicină, zootehnie etc. Colagenul este un bun agent hemostatic, are un rol deosebit în videcarea rănilor, influențează refacerea oaselor și a cartilajelor.

La temperatură camerei, colagenul este insolubil în solvenții organici și în apă. Fibrele de colagen sunt transformate în gelatină prin încălzire prelungită în apă, soluții diluate de acizi și baze, în vreme ce elastina nu suferă nici o modificare în aceste condiții.

O caracteristică importantă a colagenului este capacitatea sa de a se umfla în sisteme apoase de acizi și baze. Fibrele de colagen se contractă la temperatura de 60–65°C.

În stare nativă, colagenul, elastina și reticulina sunt rezistente la acțiunea proteazelor nespecifice. Colagenul nativ este hidrolizat numai de colagenaze, iar elastina numai de elastaze.

Așa cum s-a mai arătat, chimistul consideră că într-un lanț proteic se repetă mereu unitatea $-\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}-$, un rest de aminoacid.



Fizicianul este interesat de forma moleculei mai mult decât de compoziția sa chimică și de aceea consideră unitatea care se repetă drept "unitatea peptidică": $-\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-$.



Importanța unității peptidice constă din faptul că setul de atomi de la un C_α până la următorul C_α formează o structură planară rigidă.

Planaritatea unității peptidice, apare, în esență, datorită fenomenului de rezonanță, când dubla legătură $\text{C}=\text{O}$ și legătura simplă $\text{C}-\text{N}$ au un caracter parțial de legătură dublă.

Pentru unitatea peptidică planară sunt posibile două modificări indicate prin simbolurile trans și cis (Fig.12.1.).

Toate proteinele din animale și plante, din organisme evoluat și mai puțin evoluat, s-au dovedit a fi formate din L-aminoacizi. Cu foarte mici excepții, se mai găsesc în organisme vii și câteva peptide simple, formate din D-aminoacizi.

Linus Pauling apreciază aceasta ca o mare enigmă.

Nimeni nu știe astăzi de ce oamenii, animalele și plantele sunt formate din molecule de L-aminoacizi [5].

Se observă că grupele $-\text{C}=\text{O}$ și $-\text{N}-\text{H}$ se formează pe părți opuse ale lanțului principal în cazul unității peptidice trans, pe când, în cazul unității peptidice cis, ele sunt pe aceeași parte a lanțului principal.

Aproape la toate proteinele se formează numai unități peptidice trans. Singura excepție este când gruparea laterală atașată la al doilea atom de C_α este inelul format din cinci atomi ai prolinei (Fig.12.1.). În acest caz, se pare,

că formele cis și trans pot să se constituie în mod egal.

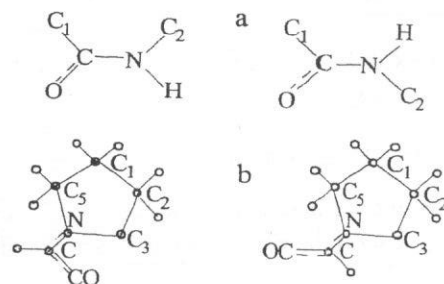


Fig. 12.1. Modificarea structurii în cis și trans a metilacetamide și în unități peptidice cu o grupă laterală de prolină (b)

În colagen, toate unitățile peptidice se formează în poziția trans și aceasta duce la formarea triplului helix.

Un factor important, valabil pentru toate proteinele, este fenomenul de asimetrie pentru resturile de aminoacizi, așa cum se arată în figura 12.2. pentru cazul alaninei.

Se poate vedea că cele patru grupări, unite în formă tetraedrică la atomul de C_{α} , sunt toate diferite și în consecință, pot avea loc două modificări posibile ale acestei molecule (doi izomeri sau enantiomeri): configurația a, L-alanina, care rotește planul luminii polarizate la stânga și configurația b, D-alanina, care rotește planul luminii polarizate la dreapta [5].

L-alanina și D-alanina sunt imaginea în oglindă a uneia pentru cealaltă configurație. Aceste forme există pentru toți aminoacizii cu excepția glicinei.

Un fapt cu totul extraordinar este că în proteinele plantelor și ale animalelor, apare unul singur dintre acești doi enantiomeri, al fiecărui aminoacid și că, acest enantiomer are o aceeași configurație pentru toți aminoacizii, adică atomul de hidrogen, gruparea ion carboxil și gruparea ion amoniu ocupă o aceeași poziție, în raport cu gruparea R în jurul atomului C_{α} .

Linus Pauling a afirmat că moleculele dextrogire și cele levogire au exact aceleași proprietăți, atât timp cât este vorba de interacțiunea lor cu substanțele

obișnuite; ele diferă ca proprietăți doar atunci când interacționează cu alte molecule dextro sau levogire.

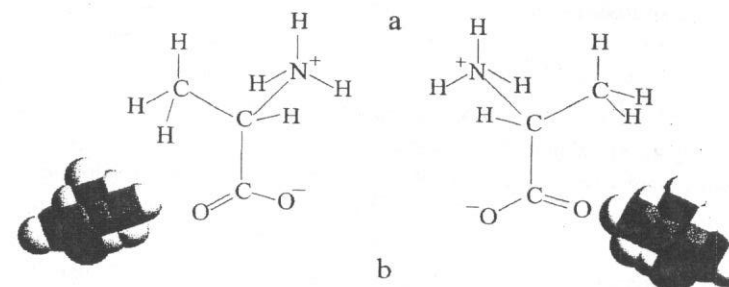


Fig. 12.2. L-alanina (a) și enantiomerul său D-alanina (b).

Pământul ar putea fi populat cu organisme vii construite din D-aminoacizi, așa cum este populat cu organisme vii bazate pe L-aminoacizi.

Un alt factor de importanță vitală pentru toate structurile biopolimerilor este *legătura de hidrogen* (Fig. 12.3.).

Se știe că valența hidrogenului este 1 și, de aceea, el poate fi legat de un alt atom, cum ar fi oxigenul.

Totuși, dacă acest atom este puternic electronegativ, cum este cazul oxigenului, norul electronic al hidrogenului este atras puternic de către oxigen și, prin aceasta, el se concentrează în regiunea dintre oxigen și hidrogen.

Astfel, încărcarea pozitivă din nucleul atomului de hidrogen este expusă pe partea opusă legăturii O—H.

Ca urmare, dacă se apropie un alt atom puternic electronegativ de hidrogen, din altă parte, norul electronic al acestui atom poate fi atras de către sarcina pozitivă expusă a protonului și aceasta poate conduce la formarea unei legături secundare slabe.

Această legătură slabă este cunoscută drept legătură de hidrogen. Este o legătură de valență secundară și forța sa este mult mai mică decât cea a unei legături covalente.

Formarea legăturilor de hidrogen este foarte importantă pentru stabilitatea legăturii biopolimerilor.

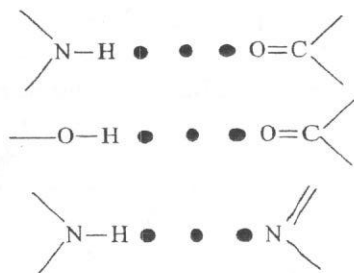


Fig.12.3. Exemple de legături de hidrogen din proteine

Legătura de hidrogen este principala legătură care se formează în apă. O moleculă de apă poate să formeze o legătură de hidrogen, de tipul $H \cdots OH$, cu o altă moleculă de apă și în același mod, câteva molecule de apă se pot uni împreună, cu rezultatul net că apa devine un lichid.

Apa este baza fundamentală a biologiei. Dacă un material biologic se usucă complet, atunci viața nu mai există. Apa este solventul vieții (pag.449).

Viața este bazată pe apă și apa este bazată pe legăturile de hidrogen și astfel, toate proprietățile biopolimerilor care fac posibilă viața, sunt, de asemenea, bazate pe legăturile de hidrogen.

Legăturile de hidrogen se stabilesc mai ales între grupările CO ale unui lanț polipeptidic și grupările NH ale unui alt lanț polipeptidic, vecin.

Punțile de hidrogen pot lega și grupările OH ale resturilor de hidroxiprolină dintr-un lanț, cu grupările CO ale altui lanț polipeptidic.

Se pot forma legături de hidrogen și între grupările CO și NH ale aceluiași lanț polipeptidic; rezultă astfel legături intracatenare.

În structura laterală a macromoleculelor de collagen se formează și legături electrovalente și covalente.

Legăturile electrovalente se formează între resturile laterale de acizilor glutamic și asparagic și resturile de lizină și arginină.

Legăturile covalente se stabilesc, de regulă, la grupările din resturile laterale ale unor aminoacizi din collagen.

12.2. BIOSINTEZA COLAGENULUI

Etapile mecanismului sintezei macromoleculei de collagen sunt similare cu cele al altor proteine (pag.693), la care se adaugă o serie de procese specifice.

Biosinteza collagenului are loc în trei trepte:

- formarea lanțurilor polipeptidice;
- formarea macromoleculei de collagen (tropocolagenul);
- formarea protofibrilelor (filamentelor), fibrilelor, fibrelor și a fasciculelor de fibre [6,7].

Sucesiunea pe etape a biosintezei collagenului poate fi împărțită în două faze specifice, în funcție de localizarea subcelulară diferită [8,9]:

- faza intracelulară;
- faza extracelulară.

Biosinteza collagenelor nefibrilare parcurge aceleași etape ca și a celor fibrilare, existând însă diferențe importante privind procesele legate de procologene. O serie de colagene nefibrilare conțin telopeptidele la capetele N- și C-terminale, nescindate, iar colagenele FACIT (Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple Helices) au poziții de atașare pentru glicozaminoglicani.

12.2.1. FAZA INTRACELULARĂ

Biosinteza collagenului în faza intracelulară are loc în fibroblaști, condroblaști și în osteoblaști. Faza intracelulară cuprinde mai multe etape: *asamblarea aminoacizilor*, *hidroxilarea* unor resturi de prolină și lizină, *formarea helixului*, *glicozilarea* și *expulzarea din celulă*.

În prima etapă a biosintezei collagenului, în fibroblaști, are loc "activarea" aminoacizilor în protoplasma celulelor și încorporarea lor în

complexe enzimă-aminoacil-adenilat, în prezența adenozintrifosfatului (ATP) și a enzimelor acti-vatoare [10].

Sursa de aminoacizi care suferă procesul de activare este foarte variată: glicina ia naștere din serină; serina și alanina au ca precursor acidul piruvic și surse nespecifice de azot; prolina derivă din acidul glutamic care, la rândul său, ia naștere din acidul α -cetoglutaric. În ceea ce privește aportul exogen, sunt necesare cantități extrem de mici de aminoacizi esențiali aromatici, de tipul tirozinei, triptofanului sau histidinei [11, 12].

Pentru colagen este caracteristic faptul că printre aminoacizii constitutivi predomină glicina (33%), prolina (12%) și într-o proporție mai mică se află lizina.

În etapa a doua, aminoacizii activați sunt transferați la acidul ribonucleic de transfer, cu care formează un complex aminoacil-ARN de transfer.

Acest transfer reprezintă, de fapt, o cataliză enzimatică a reacției de esterificare dintre gruparea carboxil și gruparea riboză a ARN. Într-o etapă următoare, acest complex este transferat pe ribozomi, unde are loc formarea unui polipeptid după tiparul codificat de ARN mesager.

Procesul de asamblare decurge rapid: 200 de aminoacizi pe minut. Aceasta înseamnă că biosinteza unei lanț polipeptidic de 1000–1200 aminoacizi are loc în 5–6 minute.

Trei lanțuri polipeptidice, sub formă de helixuri, se assemblează împreună înfășurându-se, în direcția extremităților N-terminale. Cele trei lanțuri au la capete niște prelungiri polipeptidice suplimentare, nespirate, numite *propeptide* sau *telopeptide*.

La extremitatea C-terminală se formează punți disulfidice intercatenare.

La extremitatea N-terminală este atașată și o peptidă semnal. Cele trei lanțuri polipeptidice ajung și se assemblează în reticulul endoplasmatic rugos, unde se produce și clivarea peptidei semnal și începe procesul de hidroxilare.

Din acest moment, biosinteza colagenului începe să se deosebească de sinteza proteinelor în general, datorită apariției unor procese specifice ale biosintezei, reprezentate de:

– formarea unor aminoacizi hidroxilați (hidroxiprolina și hidroxilizina), care nu existau în stare liberă în citoplasma celulei;

– elaborarea la nivelul microzomilor, a trei lanțuri polipeptidice, dintre care două pot avea un conținut diferit de aminoacizi față de al treilea (este cazul co-lagenului de tip I și a altor tipuri de colagen) [13, 14];

– necesitatea alcătuirii unor mari agregate ribozomiale, denumite polizomi, capabile să permită interconectarea celor trei lanțuri polipeptidice într-o macro-moleculă unică, cunoscută sub denumirea de *procolagen*, care se va transforma în *tropocolagen* în spațiul extracelular și din a cărei polimerizare liniară rezultă structurile fibrilare elementare [15, 16].

Procesul de hidroxilare a prolinei și lizinei la hidroxiprolină și hidroxilizină este considerat ca etapa caracteristică al stadiului de biosinteză a colagenului [17, 18, 19].

Sinteza aminoacizilor hidroxiprolina și hidroxilizina face excepție de la re-gula generală de formare a aminoacizilor, anterior sintezei proteice.

Hidroxilarea oferă colagenului un câștig în stabilitate. Numărul hidroxilărilor variază în funcție de tipul de țesut conjunctiv și de temperatura corporală (exemplu, hidroxilarea colagenului din pielea de vițel este mai intensă decât hidroxilarea colagenului din pielea de rechin) [20, 21, 22].

Hidroxilarea rezidiilor prolil pentru formarea hidroxiprolinei, aminoacidul caracteristic colagenului, este un proces enzimatic, catalizat de o oxidază, colagen-prolinhidroxilaza, implicând prezența unui substrat specific peptidil-prolină, a oxigenului atmosferic, a acidului ascorbic, a α -cetoglutaratului și a ionului feros.

Există o strânsă corelație între acțiunea colagen-prolinhidroxilazei și cantitatea de prolină hidroxilată, care duce la concluzia că toți factorii care modifică activitatea enzimei influențează, în mod indirect, formarea colagenului. În condițiile fiziologice ale activității enzimatice este probabil că anumite rezidii prolil sunt mai rapid hidroxilate decât altele, rezultând secvențe complet hidroxilate și altele doar parțial.

La hidroxilare, pare necesară o anumită secvență specifică din structura lanțului polipeptidic, și anume: Gly-X-Pro-Gly-X-Y (X, Y fiind adesea

prolină sau alanină) [23]. Frecvent, hidroxiprolina se găsește în poziția Y a unităților repetabile tripeptidice (Gly-X-Y) din zonele apolare ale macromoleculi de colagen, în poziția Y predominând prolina.

Hiroxilarea are loc la atomul de carbon 4 al prolinei.

Foarte rar, unele resturi de prolină sunt hidroxilate la atomul de carbon 3.

În aceste cazuri enzima responsabilă pentru această hidroxilare nu este propil-hidroxilaza:

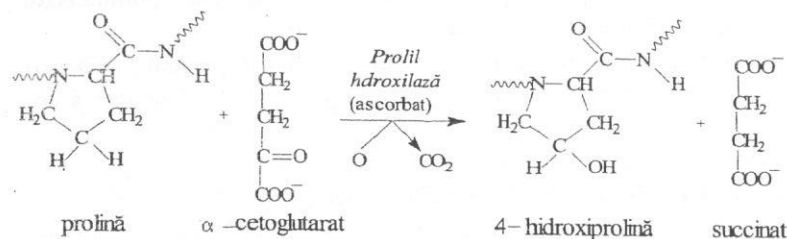


Fig.12.4. Formarea 4-hidroxiprolinei

Procesul de hidroxilare a lizinei are loc pe ribozomi prin atașarea unui grup hidroxil la C₄ al lizinei. Enzima colagen-lizinhidroxilaza este similară cu colagen-prolinhidroxilaza și hidroxilarea lizinei decurge după aceleași principii ca și hidroxilarea prolinei, iar intensitatea hidroxilării este independentă de procesul de formare a lanțurilor polipeptidice.

Tot în faza intrafibroblastică de formare a colagenului, în reticulul endoplasmatic rugos, are loc și procesul de glicozilare.

Mecanismul glicozilării colagenului este conform principiilor generale de glicozilare a glicoproteinelor.

Enzimele responsabile sunt glicozil-transferazele, care fixează la grupa hidroxilică a resturilor de hidroxilizină secvența 2-O- α -D-glucopiranozil-O- α -D-galactopiranozil (Fig.12.5.).

Glicozilarea poate avea loc și la nivelul propeptidelor (telopectidelor) C-terminale ale lanțurilor polipeptidice.

S-a demonstrat că la sinteza colagenului are loc un proces de asamblare a ribozomilor, datorită ARN mesager, rezultând în acest fel polizomi. O

moleculă de ARN poate uni 6-8 ribozomi și conține informația genetică care poate co-necta într-o secvență specifică 150-300 de resturi de aminoacizi.

Raportând aceste date la molecula de colagen, care conține într-un lanț α -polipeptidic aproximativ 1000 de aminoacizi, rezultă că pentru fiecare lanț vor trebui interconectați, sub formă de polizomi, 30-35 ribozomi individuali și cel puțin 100 de ribozomi pentru a da naștere triplului helix [21, 23, 24].

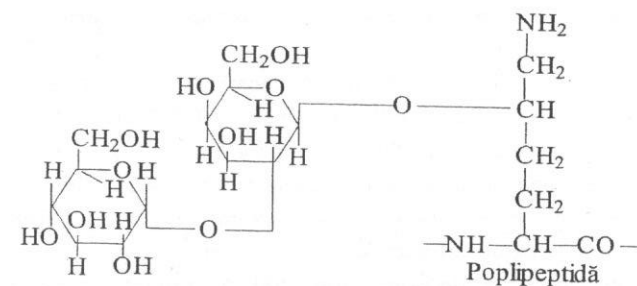


Fig.12.5. Rest de polipeptidă glicozilată

Asamblarea fragmentelor de lanț polipeptidic în fibroblaste duce la formarea lanțurilor *pro- α* (α_1 și α_2) (Fig.12.6.).

Acestea au o greutate moleculară de aproximativ 120000. Ele conțin toți aminoacizii cunoscuți în colagen.

În partea C-terminală conțin triptofan și cisteină, care se știe că sunt absenți în colagenul matur.

Lanțurile *pro- α* au la partea lor N-terminală și C-terminală secvențe de aminoacizi, care nu prezintă configurație helicoidală și pot fi considerate ca lanțuri peptidice adiționale, denumite propeptide.

Prezența cisteinei duce la formarea în partea C-terminală a unor punți disulfidice, care au un rol important în evoluția tridimensională a moleculei de colagen [25, 26, 27 28].

Triplul helix, care are la capetele terminale propeptidele și care a suferit procesul de hidroxilare și de glicozilare, trece din reticulul endoplasmatic rugos în aparatul Golgi, de unde, prin exocitoză, este trecut în mediul extra-

celular (Fig.12.6., Fig 12.7. și Fig. 12.8.) [29, 30, 31].

Prin urmare, în faza intrafibroblastică a biosintezei colagenului apare molecula de procologen, o fază tranzitorie a moleculei de colagen (*tropocolagenul*).

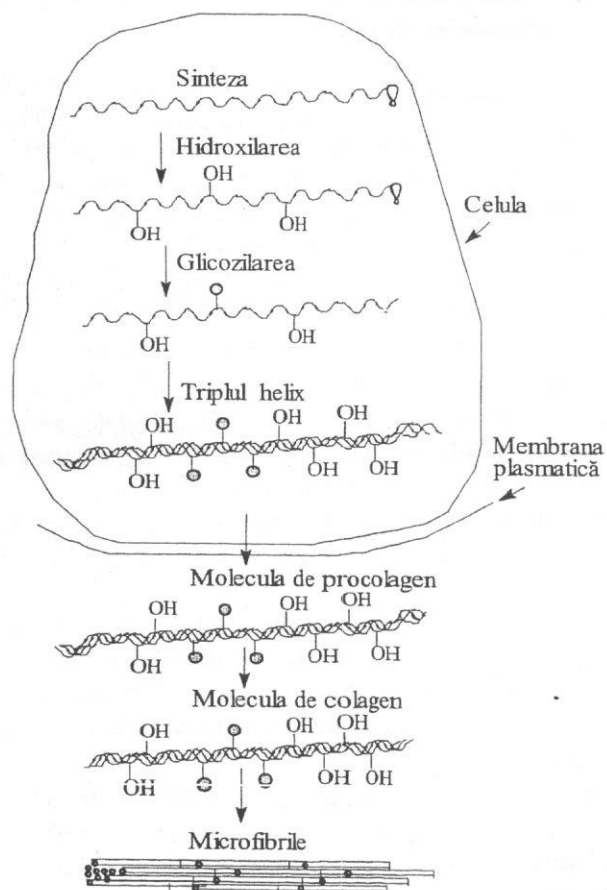


Fig.12.6. Faze ale fibrilogenezei intra și extracelulare [29].

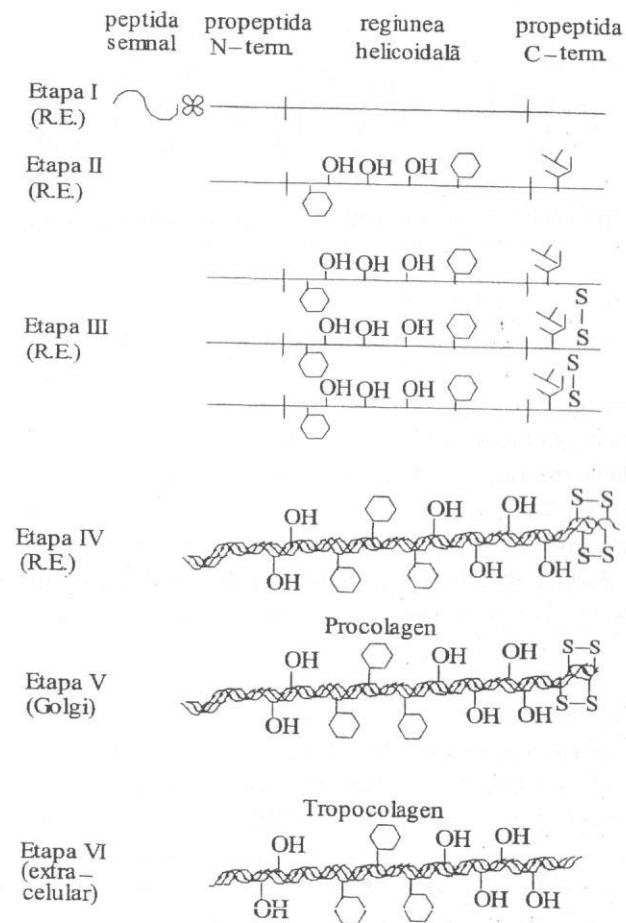


Fig.12.7. Etape ale biosintezei colagenului

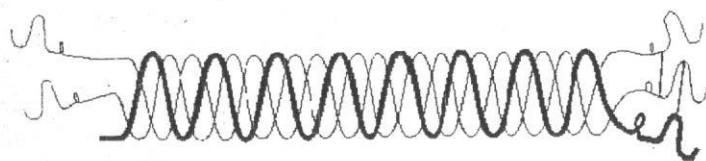


Fig.12.8. Triplul helix cu propeptidele la capetele terminale și cu legături disulfidice la capătul C - terminal.

Asocierea celor trei lanțuri polipeptidice pentru formarea procologenului începe cu propeptidele C-terminale, prin intermediul punților disulfidice intercatenare formate de resturile de cisteină [29, 30].

Transformarea procologenului în tropocolagen se realizează în spațiul extracelular prin eliminarea peptidelor adiționale, pe cale enzimatică, prin acțiunea a două metaloproteinaze, denumite procologen-peptidaze (N- și C-pep-tidaze) [31, 32, 33, 34, 35].

Cercetări *in vitro* au arătat că o cantitate de 10^7 fibroblaști sintetizează, în medie pe zi, 5,16 μ g de colagen și 100–200 μ g de acid hialuronic; ritmul sintezei este influențat de concentrația ionilor de hidrogen și de densitatea fibroblaștilor [12].

Dintre toate organele fibroblastului, reticulul endoplasmatic prezintă cele mai nete modificări în timpul diferențierii și activității celulei. La celulele active acest organit este alcătuit din tuburi și cisterne a căror pereți prezintă cu o mare abundență de granule de ribonucleoproteine.

Condroblastul sintetizează matricea cartilajului care conține 56,1% colagen, 20,3% mucopolizaharide și 22,8% proteine necolagenice. Ca și la fibroblaști, numărul condroblaștilor constituie un factor însemnat de menținere și de stimulare a unei capacități secretorii genetic determinate.

Osteoblastul, ca și fibroblastul și condroblastul, are un reticul endoplasmatic rugos foarte dezvoltat, care sugerează o capacitate intensă de sinteză a proteinelor, legată de formarea matricei în care se vor depune săruri de calciu. Această matrice conține peste 90% colagen și 0,5% mucopolizaharide și proteine necolagenice.

Din punct de vedere metabolic, se remarcă capacitatea de a funcționa cu un consum redus de oxigen și cu o cantitate mare de glucoză.

Sinteza colagenului în osteoblaști este în strânsă corelație cu procesul de calcificare a matricei elaborată de aceste celule.

12.2.2. FAZA EXTRACELULARĂ

În afara celulelor se continuă organizarea moleculelor de tropocolagen, a filamentelor (microfibrilelor), fibrilelor, fibrelor și fasciculelor de fibre.

Molecula de tropocolagen sau molecula de colagen se formează din molecula de procologen după ce cele trei lanțuri pro- α ale sale sunt complet hidroxilate și glicozilate și au pierdut prin hidroliză enzimatică (procologen-peptidaza) propeptidele de stabilizare [36, 37, 38, 39, 40, 41, 42].

Molecula de tropocolagen este formată din trei lanțuri α -polipeptidice sau α -helixuri. În această stare tropocolagenul este solubil în soluții saline neutre. Tropocolagenul are forma unui bastonaș rigid cu diametrul de 15 $\text{\AA}$ și lungimea de 3 000 $\text{\AA}$. Pentru evaluarea acestor dimensiuni, dacă se înmulțesc cu 10^7 se obține un baston cu diametrul de 1,5 cm și lungimea de 3 m.

Primele agregate care se formează în contextul organizării fibrilare sunt datorite interacțiunilor dintre grupările apolare ale moleculelor adiacente [43, 44, 45].

Formarea fibrelor în spațiul extracelular poate fi asemănată cu formarea cristalelor într-o soluție salină suprasaturată. Moleculele de colagen conțin pe suprafața lor grupări polare, care se atrag între ele, conform unor condiții matriciale optime, fapt ce are ca urmare așezarea moleculelor într-o poziție parțial suprapusă (ca țiglele de pe acoperiș).

Această așezare conduce la agregate cu suprafețe terminale oblice sau zimțate.

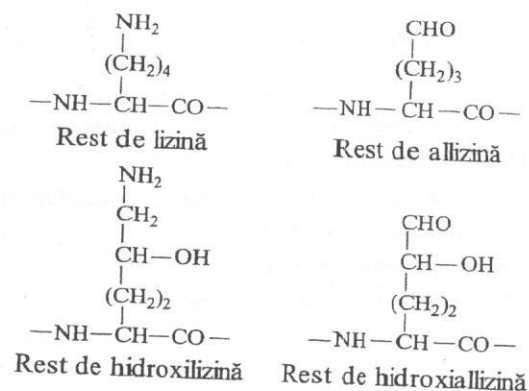
Formarea legăturilor între aceste suprafețe reprezintă primul stadiu de conectare "cap la cap" (unidirecțional) în formarea fibrililor, însoțită, desigur, de conectarea directă a grupărilor terminale. Fibrele nou formate se atașează la fibrele de colagen preexistente, proces în care mucopolizaharidele au un rol deosebit de însemnat [36, 46, 47, 48, 49].

Legăturile transversale la colagen se realizează prin intermediul grupelor carbonil din resturile laterale ale lanțurilor polipeptidice [50, 51, 52].

Este vorba de gruparea aldehydică a allizinei și a hidroxiializinei ce derivă de la lizină și hidroxilizină [53, 54] și formează punți aldolice și aldiminice [55, 56].

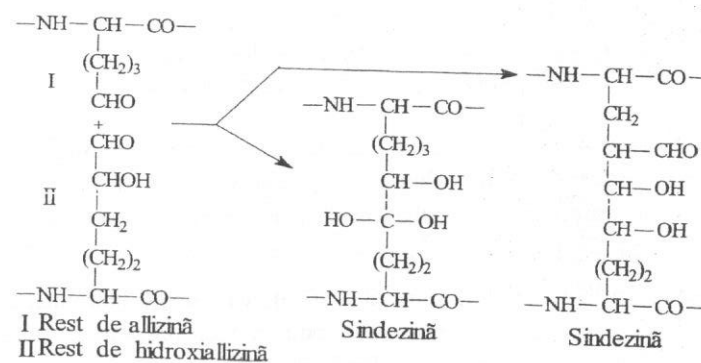
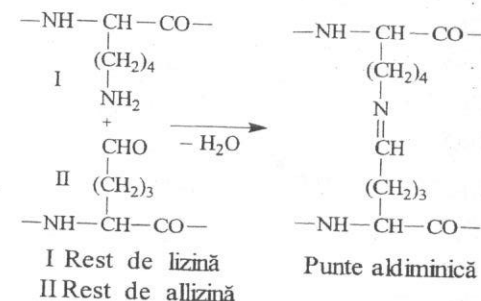
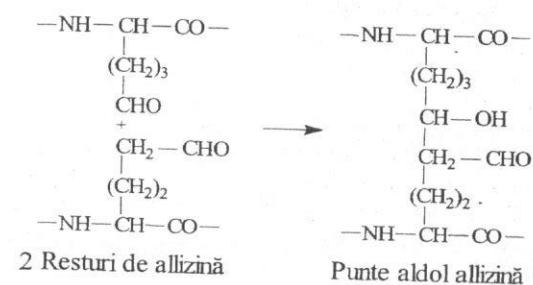
Lizina și hidroxilizina sunt oxidate de o lizinoxidază, respectiv hidroxilizinoxidază, specifice colagenului, la lizin-aldehidă (allizină), respectiv hidroxilizin-aldehidă (hidroxiializină). Enzimele sunt secretate de fibroblaști și acționează asupra procologanului, încă în interiorul celulei, conducând la formarea legăturilor transversale intramoleculare [57].

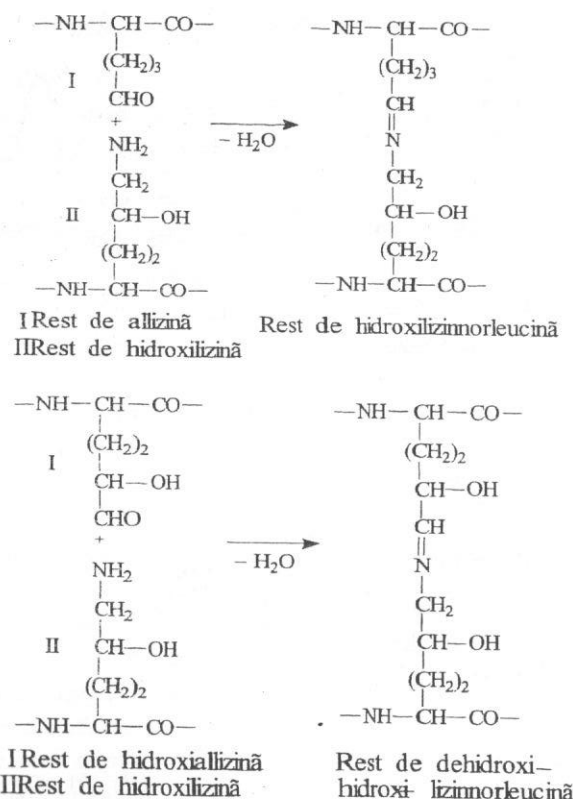
Aceste enzime își manifestă principală acțiune în afara celulei, după constituirea fibrei de colagen, permițând formarea legăturilor intermoleculare [58]:



Punțile intermoleculare rezultă din condensarea ce are loc între cele patru resturi de lizină, hidroxilizină, allizină și hidroxiializină și încă alte câteva resturi de aminoacizi de importanță mai mică. Cele două tipuri principale de punți intermoleculare sunt: aldolice și aldiminice.

Condensarea aldolică implică participarea allizinei și a hidroxiializinei și condensarea aldiminică, participarea lizinei și a hidroxilizinei, alături de allizină și hidroxiializină:





Mai multe microfibrile, vizibile numai la microscopul electronic, se asociază constituind fibrilele de collagen, vizibile la microscopul optic, iar din reuniunea mai multor fibrile rezultă fibrele de collagen, vizibile cu ochiul liber [59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67].

Patogeneza biosintezei collagenului. S-a arătat mai sus că hidroxilarea prolinei și lizinei este un proces enzimatic care implică prezența, printre altele, a acidului ascorbic (vitamina C). Deficiența în vitamină C cauzează scorbutul, o boală gravă și dureroasă, din cauza sintezei necorespunzătoare a

collagenului, care împiedică formarea unui țesut conjunctiv puternic. Scorbutul se manifestă prin degradarea gingiilor care devin sângerânde, pierderea dinților, pielea decolorată, plăgi care nu se vindecă.

Cauza scorbutului o constituie lipsa unei alimentații balansate, de exemplu, în timpul perioadei lungi a stagiului militar, mai ales la marină, a expedițiilor îndelungate în care participanții sunt lipsiți de hrană care să conțină acidul ascorbic.

În corpul uman, deficiențele de funcționare a sistemului imun duc la boala autoimună, în care fibrele de collagen sănătoase sunt sistematic distruse prin inflamații ale țesuturilor înconjurătoare. Procesele de boală rezultate se numesc Lupus eritematos și artrita reumatoidă sau țesut collagenic bolnav.

12.3. COMPOZIȚIA ȘI STRUCTURA COLAGENULUI

Pentru a înțelege structura complexă a collagenului, se va folosi clasificarea ordonării structurale a proteinelor propusă de K. Lindström-Lang, Bernal (1958) și anume:

- structura primară, care reprezintă înălțuirea aminoacizilor în catenele polipeptidice ale macromoleculei de collagen;
- structura secundară, care se referă la un singur lanț polipeptidic (helix minor) din triplul helix al macromoleculei de collagen;
- structura terțiară – conformația moleculară de triplu helix a macromoleculei de collagen (tropocollagenul);
- structura cuaternară, care reprezintă modul de agregare a macromoleculei de collagen la formarea fibrilelor, fibrelor și a țesutului collagenic.

12.3.1. COMPOZIȚIA ÎN AMINOACIZI

Din cei 20 de aminoacizi care participă la formarea macromoleculei de collagen (tabelul 12.1.), din punct de vedere cantitativ, cei mai importanți sunt: glicina, reprezentând aproximativ 33% din totalul aminoacizilor, proline și hidroxiprolina, 22,1%, alanina, 11%, acizii glutamic și asparagic, 11,8%, lizina și arginina, 7,8%, serina, 3,6% etc.

1-Aminoacid, g, la 100 g colagen; 2-Greutatea moleculară a unui aminoacid minus 18 (reprezintă apa rezultată la hidroliza legăturii peptidice) și împărțit la greutatea moleculară; acesta este un criteriu suplimentar de precizie la realizarea analizelor; 3-g Rest de aminoacid la 100 g colagen; 4-n-14/greutate mol. $100 = \%$ azot aminoacid; 5-Azot, % din azotul total al colagenului; 6-Molecule de aminoacid la 100g colagen; 7-Molecule de aminoacid la 1 moleculă de colagen; 8-Molecule de aminoacid la 100 molecule de aminoacid.

În tabelul 12.2. sunt prezentate o serie de date de caracterizare a aminoacizilor din colagen, conform explicațiilor din partea de jos a tabelului [68].

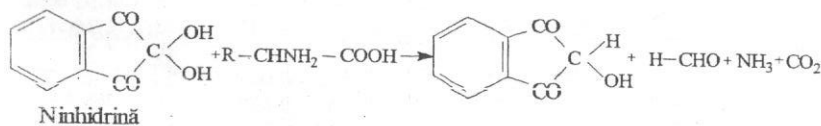
Determinarea cantitativă a hidroxiprolinei este o cale de a se determina conținutul în colagen din țesuturile conjunctive.

Dintre metodele utilizate pentru determinarea cantitativă a hidroxiprolinei sunt și cele care depind de una din următoarele reacții colorimetrice: reacția cu ninhidrină, reacția cu isatină și oxidarea hidroxiprolinei la compuși care formează un cromofor cu p-dimetilaminobenzaldehida.

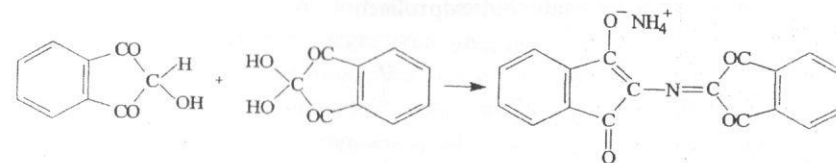
Reacția ninhidrinei cu hidroxiprolina este mult mai puțin sensibilă decât reacția dintre ninhidrină și alți aminoacizi.

Cromoforul format cu prolina și hidroxiprolina absoarbe la lungimi de undă mai joase decât cromoforii formați cu alți aminoacizi, dar reacția nu poate fi folosită ca analiză specifică. În cea mai bună situație, hidroxiprolina trebuie să fie izolată cu procedee cromatografice, înainte utilizării reacției cu ninhidrina.

Ninhidrina (tricetohidrină-hidrat) dă cu acizii aminici o colorație albastră intensă. În prima etapă aminoacizii sunt degradați la aldehide:

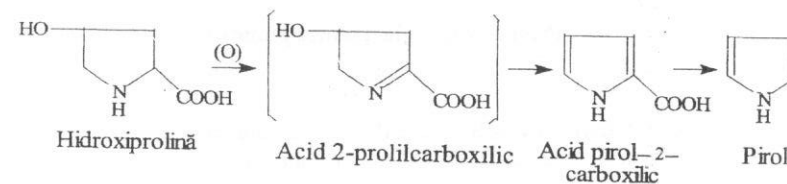


Colorantul provine din condensarea cetoalcoolului ce se formează la reducerea ninhidrinei, cu o nouă moleculă de ninhidrină și probabil și cu o moleculă de amoniac:



Reacția hidroxiprolinei cu isatina duce la formarea unei β -oxime (isatoxima), care este mult mai sensibilă și mult mai specifică, dar dă un cromofor similar cu al hidroxiprolinei. În general, reacția cu isatină este folosită numai pentru pulverizarea hârtiei cromatografice.

Cea mai specifică reacție pentru analiza cantitativă a hidroxiprolinei este oxidarea aminoacidului la acid pirol-2-carboxilic sau la pirol și apoi cromoforul se formează cu p-dimetilaminobenzaldehidă. Avantajul metodei oxidative pentru analiza cantitativă a hidroxiprolinei este că nu cere tehnică cromatografică:



Aminoacizii în alimentație. În cursul digestiei, în organismul animal proteinele sunt hidrolizate până la aminoacizi. Pe baza experiențelor de alimentație cu amestecuri de aminoacizi s-a constatat că unii aminoacizi sunt indispensabili creșterii animalelor tinere și funcționării normale a organismului adult. Acești aminoacizi, numiți *aminoacizi esențiali* sau *indispensabili*, nu sunt sintetizați de către organismul animal și trebuie preluați de acesta din hrană.

Alți aminoacizi numiți *aminoacizi neesențiali* pot lipsi din hrană fără nici un inconvenient, ei putând fi sintetizați de către organismul animal. În tabelul 12.3. sunt prezentați aminoacizii esențiali din colagenele mai multor specii de animale. Din acest tabel rezultă că aminoacizii esențiali din compoziția cola-

genelor prezentate sunt sărace în aminoacizi esențiali, aceștia reprezentând între 8,32 % și 15,7 % (moli aminoacizi la 100 moli aminoacizi).

Hidroxirolina se găsește în colagenul mamiferelor într-o proporție relativ constantă de 9-10% și de aceea, prin determinarea sa cantitativă, se poate calcula conținutul în colagen din țesuturi. În afară de elastină care conține 1% hi-droxiprolină, aceasta nu se mai găsește în nici o altă proteină din țesuturile ani-male.

Prezența inelului pirolidinic, din structura prolinei și hidroxirolinei, constituie unul dintre factorii fundamentali care asigură stabilitatea structurală a lanțurilor polipeptidice ale macromoleculei de colagen, generând un grad ridicat de rigiditate. Aceste inele influențează stereochemic dispoziția spiralată a lanțului polipeptidic alături de mezomeria legăturii peptidice, prin limitarea rotațională a legăturilor din catena lanțului.

Așa se explică de ce un lanț polipeptidic, bogat în prolină și hidroxirolină, rămâne în soluție în starea spiralată inițială, chiar dacă nu mai conține legături de hidrogen între spire. Dispoziția spiralată se păstrează până la temperaturi ce ating 90° C.

Tabelul 12.3.

Compoziția în aminoacizi esențiali a diferitelor colagene
(moli aminoacizi / 100 moli aminoacizi) [2].

Aminoacidul	Piele de mamifere	Piele de vițel	Piele de batog	Echino- derme	Celente- rate
Valină	2,4	2,42	1,9	3,0	3,4
Leucină	2,4	2,77	2,3	2,2	3,7
Izoleucină	1,0	1,36	1,1	1,3	2,3
Fenilalanină	1,2	1,25	1,3	0,9	1,2
Treonină	0,28	1,92	2,5	3,5	3,9
Metionină	0,6	0,3	1,3	0,2	0,9
Histidină	0,48	0,6	0,8	0,3	0,5
Triptofan	urme	urme	urme	urme	urme

Numeroase cercetări au demonstrat că există o corelație între conținutul în hidroxirolină a fibrei de colagen și rezistența la variate modalități de denaturare.

Hidroxirolina, deși se găsește în cantitate mică în colagen, în jur de 1%, re-prezintă un component important, deoarece prin intermediul său se formează legături între moleculele de colagen și glucide (Fig.12.9.).

Raportând datele cantitative la numărul total de aminoacizi evidențiați în colagen, rezultă că glicina constituie 3 din 9 resturi, proline și hidroxirolina 2 din 9, alanina 1 din 9, aminoacizii polari (acidul asparagic, acidul glutamic, lizi-na, arginina) 2 din 9, iar restul de 1 din 9 cuprinde variate tipuri de aminoacizi neutri.

Din colagen lipsesc aminoacizii cistina și cisteina.

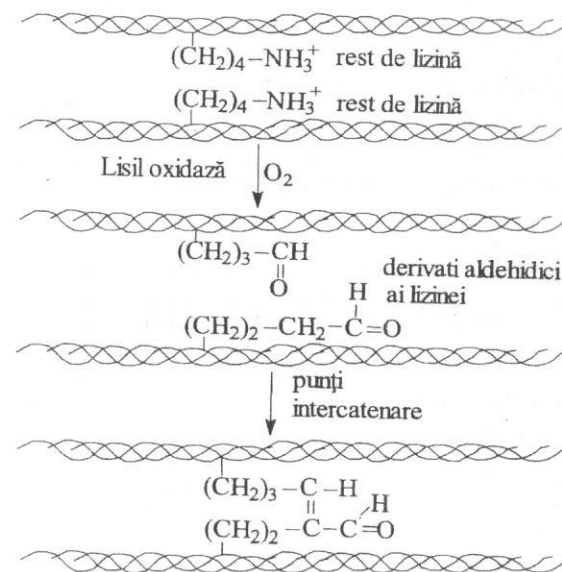


Fig.12.9. Formarea de punți transversale intercatenare prin intermediul lizinei.

12.3.2. TIPURI DE COLAGEN

Colagenul este o proteină fibroasă foarte abundentă în regnul animal, prezentă în matricea extracelulară și în țesutul conjunctiv. La vertebrate, este prezent în toate organele în proporții mai mari sau mai mici în funcție de organ (tabelele 12.4., 12.5. și 12.6.).

Tabelul 12.4.

Conținutul mediu de colagen a diferitelor organe [68, 69].

Organul	Conținutul mediu în colagen, % din organul umed	Organul	Conținutul mediu în colagen, % din organul umed
Tendon	25-35	Mușchi	1,0-2,0
Piele	20-30	Inimă, organe parenchimale	
Cartilaj și os	10-20	(ficat, rinichi)	0,5-2,0
Peretele vaselor sanguine	5-12	Sistemul nervos central	0,2-0,4

Tabelul 12.5.

Conținutul în colagen separat din organele diferitelor organisme [68, 69].

Organul	Organismul	Conținutul mediu de colagen, % din substanța uscată a organului
Piele	Porc de mare	63
	Șobolan	67
	Câine	64
	Bovine	80
	Om	72
Aortă	Șobolan	25
	Bovine	23
	Porcine	16
	Om	12 - 24
Ficat	Șobolan	0,64

Porc de mare	0,82
Bovine	1,97
Porcine	2,46
Om	3,90

Tabelul 12.6.

Distribuția colagenului în grosimea pielii crude de bovine [68, 70].

Locul de prelevare a probei din	Numărul stratului	Conținutul în colagen, % din substanța uscată a pielii
Din partea dinspre față a pielii (stratul papilar)	1	54
	2	65
	3	67
	4	88
	5	89
Din partea dinspre carne a pielii (stratul reticular)	6	85
	7	89
	8	95
	9	86
	10	85
	11	85
	12	87

Molecula de colagen este foarte diferită de alte molecule proteice, cu toate că sunt multe compatibilități cu acestea.

Astbury împarte proteinele fibroase în două grupe: grupa KMEF, constând din keratină, miozină, epidermină și fibrinogen și grupa colagenului.

Fibroina mătăsii ca și colagenul au o structură dominată de mulți aminoacizi cu lanțuri laterale mici (glicină, alanină, serină etc.).

Conformația fibroinei a fost definită ca α -helicoidală, dar multe păreri au condus la forma β , la tipul de fibroină cu perioada axială de 6,9 - 6,95 Å. Studiul mătăsii Ordinului Hymenoptera, subordinului Aculeata a condus la

forma de α -helix, în timp ce himenopterele cele mai primitive, care nu posedă încă o înfățișare de viespe, denumite *Symphyta* sunt mai ales de tip β fibroină.

Cu toate acestea, la familia *Symphyta* mătasea s-a dovedit a avea o structură de collagen (Rudall). Aceasta s-a descoperit și la viespea ferăstrău de agrișă comună, *Nematus ribesii*, la examinarea diagramelor cu raze X a coconului.

Identificarea structurii de tip collagen s-a dovedit la fibrele trase din glandele serigene ale larvelor. Aceste mătăsi, care au, totuși, multe caracteristici diferite de cele ale collagenului, pot fi grupate împreună prin faptul că sunt destinate unor funcții structurale extracelulare și au un conținut bogat în aminoacizi cu lanțuri laterale scurte.

Fibre extrase din glandele serigene de la *Nematus ribesii*, analizate cu ajutorul razelor X au dovedit prezența collagenului (tabelul 12.7.).

La diferitele mătăsi, după proveniență, au fost admise următoarele tipuri de structuri: tipul paralel- β -fibroină, tipul cross- β -fibroină, tipul α -helicoidal și tipul collagen.

Între tipurile paralel- β -fibroină și collagen s-a apreciat o foarte mare înrudire.

Tabelul 12.7.

Compoziția în aminoacizi a mătăsii care conține collagen și fibroină (resturi de aminoacizi / 1000)

Aminoacidul	Mătase collagen	Cuticula viermelui collagen	Melc, peretele corpului gelatină
Glicină	275	334	321
Alanină	138	100	72
Valină	38	20	22
Leucină	22	30	24
Izoleucină	20	16	12
Serină	110	83	61
Treonină	35	49	28
Metionină	—	1	1
Acid aspartic	58	62	67

Acid glutamic	98	85	99
Lizină	17	16	8
Hidroxilizină	18	—	8
Arginină	40	22	51
Histidină	5	1	3
Tirozină	25	2,3	9
Fenilalanină	4	5,7	10
Prolină	97	7,7	104
Hidroxiprolină	—	165	100

Deoarece compozițiile în aminoacizi ale unor colagene și ale unor fibroine este asemănător, se susține că aceste colagene, ce se găsesc împreună cu fibroinele din unele mătăsi, au derivat de la moleculele de tip fibroină.

Tabelul 12.8.

Compoziția în aminoacizi a fibroinei din mătasea de la *Galleria mellonella*, a elastinei, rezilinei și collagenului (resturi / 1000).

Aminoacidul	Fibroină	Elastină	Rezilină	Colagen
Glicină	318	332	379	310
Alanină	249	223	109	86
Valină	52	141	28	24
Leucină	68	64	23	27
Izoleucină	35	27	16	18
Serină	167	8	79	50
Treonină	18	8	30	37
Acid aspartic	21	7	101	77
Acid glutamic	5	15	46	94
Arginină	13	7	35	45
Lizină	2	4	5	20
Tirozină	3	7	27	5
Fenilalanină	2	35	25	9
Prolină	47	109	76	97
Hidroxiprolină	—	—	—	77

Bailey și Weis-Fogh (1961) compară compoziția rezilinei cu aceea a mătăsii provenită de la *Bombyx mori*. În tabelul 12.8. (Ruhdal J.), se prezintă compoziția în aminoacizi a fibroinei din mătasea de la *Galleria mellonella* a elastinei, rezilinei și colagenului.

Din tabelul 12.8. rezultă că fibroina și elastina au cantități aproape identice de glicină și alanină. Diferențe importante sunt la conținutul de valină, serină și prolină.

La fibroină, compoziția în aminoacizi este asemănătoare cu aceea a colagenului, cu excepția deficitului în resturi de iminoacizi.

În nomenclatura colagenelor, fiecare din cele 20 de tipuri identificate până prezent, sunt trecute în ordinea în care au fost cunoscute [71]. Notarea completă a moleculelor de colagen cuprinde lanțurile constitutive, denumite lanțuri α , tipul de colagen care aparține acestor lanțuri, precum și raportul în care acestea se găsesc în constituția moleculei.

Astfel, cele trei lanțuri asociate într-o moleculă sunt genetic identice, ca în cazul colagenului tip II [$\alpha_1(\text{II})$]₃ sau tip III [$\alpha_1(\text{III})$]₃ sau aparținând la două clase genetice diferite, ca în cazul tipului I [$\alpha_1(\text{I})$]₂ $\alpha_2(\text{I})$, aparținând la trei clase genetice diferite, de exemplu, colagen tip VI, [$\alpha_1(\text{VI})$ $\alpha_2(\text{VI})$ $\alpha_3(\text{VI})$].

Tipurile de colagen au fost împărțite în șapte grupe în funcție de caracteristicile structurale asemănătoare și de structurile polimerice pe care aceștia le formează (Fig.12.10.) [72,130].

Astfel, tipurile de colagen I, II, III, V și IX formează clasa colagenelor fibrilare (A). Aceste colagene se asociază în fibrile, fibre, fascicule de fibre ca în organe și țesuturile conjunctive (derm, cartilaj, tendon, os etc.).

În grupa B fac parte colagenele tip IV, VIII, X care formează rețele ca în membranele bazale, iar tipurile IX, XII, XIV, XVI și XIX formează clasa colagenelor asociate, FACIT (*Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple Helice*) (C). Colagenul tip VI se asociază sub formă de filamente (D); colagenul tip VII formează fibrile de ancorare (E); colagenele tip XIII și XVII parțial caracterizate, formează domeniul transmembranar (F) și colagenele XV, XVIII, XX sunt parțial caracterizate.

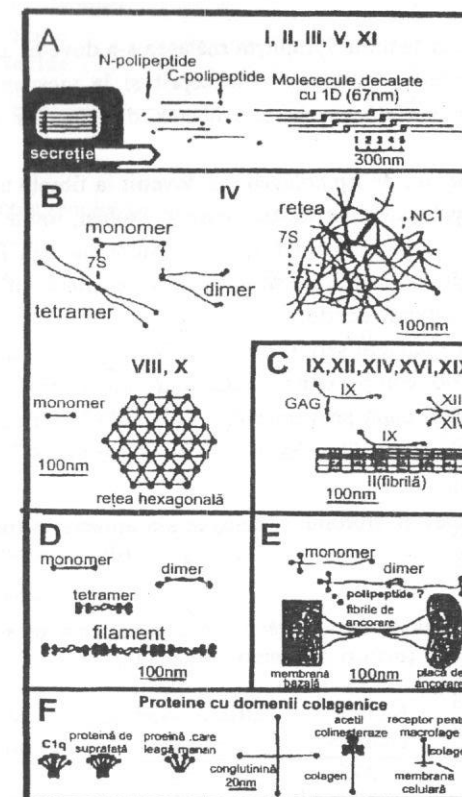


Fig.12.10. Reprezentarea schematică a structurii diferitelor colagene. Grupele de colagen F și G nu sunt reprezentate deoarece structura lor nu este bine definită. A. colagene fibrilare; B. Colagene care formează rețele; C. Colagene asociate structurii fibrilare; D. Colagene microfibrilare; E. Colagene care formează fibrile de ancorare; F. proteine necolagenice care au în structură zone triplu helicoidale [72, 130].

După cum se știe, colagenul, este o proteină compusă din trei lanțuri polipeptidice asociate. Aceste lanțuri se pot combina în diferite feluri, de aceea se poate vorbi despre colagene, nu de colagen. Fiecare tip de colagen are particularități proprii de structură și este localizat în organism în organe specifice.

Colagenul tip I, $[\alpha_1(I)]_2\alpha_2(I)$, reprezintă circa 90% din totalul colagenelor țesuturilor conjunctive; el participă în constituția pielii, tendoanelor, corneei, a organelor interne etc. Colagenul tip I a fost cel mai mult studiat, obținându-se cele mai multe informații privind structura și proprietățile colagenelor.

Colagenul tip II, $[\alpha_1(II)]_3$, este prezent în cartilaje, în stroma corneeană pri-mară. Cu toate că lanțurile $\alpha_1(I)$ și $\alpha_1(II)$ au mărimi similare, ele sunt produse de gene diferite.

Structural, lanțurile $\alpha_1(I)$ și $\alpha_1(II)$ au caracteristici asemănătoare cu deosebirea că lanțul $\alpha_1(II)$ are cele mai multe resturi de Lys. Din structura sa, multe resturi de Lys au fost transformate în resturi de Hyl și multe dintre acestea din urmă au fost glicozilate.

Colagenele II, IX și XI participă la formarea fibrelor striate din cartilaje. Colagenele II și XI aparțin din grupa colagenelor fibrilare și sunt strâns legate din punct de vedere structural, diferind în special prin N-propeptidele lor.

Colagenul IX are o structură diferită, dar cu toate acestea, este un constituant esențial al fibrelor striate din cartilaje.

Alte două tipuri de colagen se găsesc, de asemenea, în cartilaje, colagenele VI și X, dar formează structuri distincte. Colagenul VI se găsește în special la periferia condrocitelor, formează filamente perlate. Aceste filamente sunt formate, probabil, prin interacțiunea colagenului VI cu acidul hialuronic.

Colagenul X, *in vivo*, este asociat cu fibrilele striate sau cu un suport care poate să corespundă structurilor [73].

Colagenul de tip VI face parte din clasa colagenelor microfibrilare, formând rețele filamentoase în care fibrile fine se asociază slab. Are un grad ridicat de imunogenitate [74].

Molecula de colagen tip VI este compusă din trei lanțuri polipeptidice diferite. Lanțurile sunt compuse dintr-o zonă helicoidală și câte o zonă globulară dezvoltată la fiecare capăt [75]. Asamblarea moleculelor de colagen tip VI în structurile filamentoase se realizează prin unirea longitudinală a două sau patru molecule și acești dimeri sau tetrameri se asociază liniar în structuri microfibrilare.

Colagenele FACIT nu formează fibrile, dar se atașează la suprafața acestora. Structural, ele constau din domenii triplu-helicoidale scurte, întrerupte de secvențe necolagenice.

Colagenul FACIT mult studiat este de tipul IX, care se găsește din abundență la suprafața fibrililor de colagen tip II în țesuturile cartilaginoase.

Colagenul tip IX este o componentă importantă a stromei corneene primare, a notocordului și corpului vitros. Este format din trei lanțuri polipeptidice diferite, care conțin câte trei domenii colagenice și patru domenii necolagenice așezate alternativ [76, 77].

Colagenul tip XXIV este un colagen fibrilar, se găsește la vertebrate și are caracteristici ale colagenelor de nevertebrate. Se găsește în țesuturi împreună cu colagenele tip I și II și participă la formarea fibrililor heterotipici alături de colagenele V și XI.

Colagenul tip XXIV constă dintr-un domeniu triplu helicoidal flancat de secvențe de propeptide. Structura triplului helix și a propeptidelor terminale sunt comune colagenului nevertebratelor.

Se consideră colagenul tip XXIV drept molecula care a contribuit la formarea colagenului tip I [78].

Pentru 19 tipuri de colagen prezentate în tabelul 12.9. sunt 32 de gene care codează lanțurile polipeptidice acestor tipuri de colagen.

Tabelul 12.9.

Tipurile de colagen

Tip	Constituent	Tripluhelix	Localizare	Gena
I	$\alpha_1(I)$	$[\alpha_1(I)]_2\alpha_2(I)$	Reprezintă 90% din colage-	Col I A1

	$\alpha_2(\text{I})$	$[\alpha_1(\text{I})]_3$	nul vertebrelor. Abundent în țesut conjunctiv, derm, tendon, ligamente, oase, mușchi, corne, pereți vasculari. Puțină hidroxiprolină. Fibrile groase 80-160 nm în diametru.	Col1 A2
II	$\alpha_1(\text{II})$	$[\alpha_1(\text{II})]_3$	Reprezintă 50% din proteina cartilajului hialin și articular. Formează fibrili fini în substanța fundamentală a cartilajului hialin împreună cu colagenele de tip IX, X și XI. Corpul vitros. Multă hidroxiprolină.	Col2 A1
III	$\alpha_1(\text{III})$	$[\alpha_1(\text{III})]_3$	Constituientul fibrelor de reticulină din țesuturile hematopoietice. Alături de Col1 în piele, vasele sanguine, organe interne. Este collagen de granulație (în țesut conjunctiv vascularizat la cicatrizarea rănilor, ulcerărilor). Conține multă hidroxiprolină și hidroxilizină.	Col3 A1
IV	$\alpha_1(\text{IV})$ $\alpha_2(\text{IV})$ $\alpha_3(\text{IV})$ $\alpha_4(\text{IV})$ $\alpha_5(\text{IV})$ $\alpha_6(\text{IV})$	$[\alpha_1(\text{IV})]_2\alpha_2(\text{IV})$ $[\alpha_1(\text{IV})]_3$ $[\alpha_3(\text{IV})]_2\alpha_4(\text{IV})$ $\alpha_3(\text{IV})\alpha_4(\text{IV})\alpha_5(\text{IV})$ $\alpha_1(\text{IV})\alpha_6(\text{IV})?$ $\alpha_3(\text{IV})\alpha_6(\text{IV})?$	În toate membranele bazale, în cristalin, în glomerulul nefronului, parte a sistemului de filtrare în capilare. În mușchi.	Col4 A1 Col4 A2 Col4 A3 Col4 A4 Col4 A5 Col4 A6
V	$\alpha_1(\text{V})$ $\alpha_2(\text{V})$ $\alpha_3(\text{V})$ $\alpha_4(\text{V})$	$[\alpha_1(\text{V})]_2\alpha_2(\text{V})$ $\alpha_1(\text{V})\alpha_2(\text{V})\alpha_3(\text{V})$ $[\alpha_1(\text{V})]_3$ $\alpha_1(\text{V})\alpha_4(\text{V})?$	Cantitativ este un component minor. Este asociat cu Col1 în intestine și membranele bazale.	Col5 A1 Col5 A2 Col5 A3
VI	$\alpha_1(\text{VI})$ $\alpha_2(\text{VI})$ $\alpha_3(\text{VI})$	$\alpha_1(\text{VI})\alpha_2(\text{VI})\alpha_3(\text{VI})$	În țesuturi conjunctive, cartilaje, țesut intestinal, în mușchi și în piele, asociat cu Col1.	Col6 A1 Col6 A2 Col6 A3
VII	$\alpha_1(\text{VII})$	$[\alpha_1(\text{VII})]_3$	Fibrili de ancorare la joncțiunea dermal-epidermală.	Col7 A1

			corne, mucoasa bucală și esofagiană.	
VIII	$\alpha_1(\text{VIII})$ $\alpha_2(\text{VIII})$	$[\alpha_1(\text{VIII})]_2\alpha_2(\text{VIII})$ $[\alpha_1(\text{VIII})]_3$	Localizat în celulele endoteliale.	Col8 A1
IX	$\alpha_1(\text{IX})$	$\alpha_1(\text{IX})\alpha_2(\text{IX})\alpha_3(\text{IX})$	În cartilaj asociat cu Col1, Cantitativ minor. FACIT collagen.	Col9 A1 Col9 A2 Col9 A3
X	$\alpha_1(\text{X})$	$[\alpha_1(\text{X})]_3$	În cartilaj mineralizat.	Col10 A1
XI	$\alpha_1(\text{XI})$	$\alpha_1(\text{XI})\alpha_2(\text{XI})\alpha_3(\text{XI})$	În cartilaj. Minor cantitativ.	Col11 A1
XII	$\alpha_1(\text{XII})$	$[\alpha_1(\text{XII})]_3$	Împreună cu Col1 și Col3. Minor cantitativ. FACIT collagen.	Col12 A1
XIII	$\alpha_1(\text{XIII})$	$[\alpha_1(\text{XIII})]_3$	În majoritatea țesuturilor. Minor cantitativ.	Col13 A1
XIV	$\alpha_1(\text{XIV})$	$[\alpha_1(\text{XIV})]_3$	Împreună cu Col1 și Col2. Cartilaj articular.	Col14 A1
XV	$\alpha_1(\text{XV})$	Nedeterminat	Lama bazală a mușchilor.	Col15 A1
XVI	$\alpha_1(\text{XVI})$	$[\alpha_1(\text{XVI})]_3$	FACIT collagen.	Col16 A1
XVII	$\alpha_1(\text{XVII})$	$[\alpha_1(\text{XVII})]_3$	În structurile de la suprafața bazală a celulelor epiteliale. FACIT collagen.	Col17 A1
XVIII	$\alpha_1(\text{XVIII})$	Nedeterminat	Zona membranelor bazale.	Col18 A1
XIX	$\alpha_1(\text{XIX})$	Nedeterminat	Zona membranelor bazale. FACIT collagen.	Col19 A1

Notă. FACIT collagen (Associated Collagens with Interrupted Triple helices), se referă la tipurile de collagen care sunt și proteoglicani. Acestea sunt tipurile: IX, XII, XIV, XIX și XXI.

12.3.3. STRUCTURA PRIMARĂ

În perioada 1900–1910, chimistul german Emil Fischer a obținut date care sprijineau ipoteza că aminoacizii din proteine se află combinați în lanțuri lungi, numite catene polipeptidice, iar legătura formată între doi aminoacizi, este *legătura peptidică* [79].

F. Sanger a determinat pentru prima dată secvența aminoacizilor din lanțurile polipeptidice de insulină.

Folosindu-se metoda Sanger, s-a determinat structura primară a hemoglobinei și a mai multor proteine.

Molecula de collagen tip I, de la vertebrate, are o formă de bastonaș, cu lungimea de 3000Å și diametrul de 15Å, este formată din trei lanțuri α -polipeptidice, dublu spiralate, din care, două lanțuri α_1 și un lanț α_2 , în cazul mai multor colagene, care diferă între ele prin compoziția în aminoacizi (tabelul 12.10.).

Masa moleculară a collagenului este de aproximativ 300000.

Un lanț α -polipeptidic este format din aproximativ 1050 aminoacizi, așezați într-o anumită ordine și legați între ei prin legături peptidice.

Greutatea moleculară a unui lanț este de 95000 – 100000.

Tabelul 12.10.

Compoziția în aminoacizi a lanțurilor α_1 și α_2
(numărul de resturi de aminoacizi)

Amino-acidul	Piele de vițel		Piele de porc		Piele de găină		Piele de om	
	α_2	α_1	α_2	α_1	α_2	α_1	α_2	α_1
Total	1032	1043	1041	1050	1036	1041	1012	1015
Hidroxiprolină	81	90	101	115	101	112	91	101
Acidul asparagic	47	47	47	44	52	44	44	42
Treonina	18	17	19	18	21	20	18	17
Serina	25	35	34	37	32	28	35	39
Metionina	4	7	4	7	5	9	5	7
Acidul glutamic	73	80	68	80	69	80	67	65
Prolina	124	141	127	144	121	125	114	133
Glicina	341	339	340	336	339	341	339	334
Alanina	104	125	112	115	108	134	110	117
Valina	35	19	36	18	29	15	34	20

Izoleucina	18	9	15	7	18	7	14	7
Leucina	35	22	32	21	33	21	34	20
Tirozina	3	4	2	2	2	2	4	2
Fenilalanina	17	13	12	19	14	13	11	13
Hidroxilizina	11	5	9	5	10	5,4	9	5
Histidina	8	3	8	2	8	2	11	2
Lizina	22	33	23	30	22	31,2	22	31
Arginina	59	52	52	50	52	52	52	50

Analizând datele tabelului 12.10., rezultă că lanțurile α_1 sunt mai bogate în aminoacizi polari și sărace în aminoacizi neutri, comparativ cu lanțurile α_2 .

La cele mai multe dintre nevertebrate s-a găsit collagen în cantități mari.

Caracatița calmar (*Logigo*), râma (*Lumbricus*), peștele panglică (*Diphylobotrium*), midia de mare (*Mytilus*), anemona de mare (*Metridium*) și o altă anemonă de mare (*Actinea*) conțin collagen format din molecule cu un singur tip de lanț.

12.3.3.1. STUDIUL SECVENȚEI AMINOACIZILOR DIN LANȚURILE α -POLIPEPTIDICE

Formarea triplului helix din lanțuri oarecare, în soluție, conduce la concluzii importante în ceea ce privește natura lanțurilor α și asocierea lor la formarea triplului helix.

Kühn și colab., Beier și Engel au arătat că răsucirea controlată a lanțurilor polipeptidice din soluțiile de collagen denaturat, la pH acid, duce la formarea de molecule de collagen din lanțuri α identice, cu proprietăți fizice asemănătoare cu cele ale collagenului nativ. Kühn și colab. au demonstrat că lanțurile α_1 izolate din collagenul de vițel pot forma un trimer de tip colagenic.

Tkocz și Kühn au arătat că o moleculă $(\alpha_1)_3$ are aproximativ aceeași stabilitate ca și molecula formată din $(\alpha_1)_2\alpha_2$, în timp ce $(\alpha_2)_3$ este mult mai puțin stabilă. S-a constatat că dintr-un amestec de lanțuri α_1 și α_2 se formează de

preferință $(\alpha_1)_2\alpha_2$.

Pe baza conținutului de prolină și hidroxiprolină, care este un factor major în stabilitatea moleculei de colagen, ar fi de așteptat ca $(\alpha_1)_3$ să fie mai stabil decât $(\alpha_1)_2\alpha_2$, iar $(\alpha_2)_3$ să fie cel mai puțin stabil. Dar s-a constatat că există o anumită specificitate la interacția dintre două lanțuri α_1 și un lanț α_2 , la formarea moleculei de colagen, datorită secvențelor Gly-X-Y, care reprezintă o condiție minimă pentru formarea triplului helix.

Este de presupus că această specificitate derivată din secvența aminoacizilor, se datorește, fie interacțiilor lanțurilor laterale, fie efectelor locale asupra conformației, rezultând dintr-o mai bună potrivire.

Studiul secvenței aminoacizilor, din lanțurile polipeptidice ale colagenului, a întâmpinat dificultăți din cauza dimensiunilor mari ale lanțurilor și a monotoniei relative a succesiunii aminoacizilor. De aceea, pentru determinarea secvenței aminoacizilor, se procedează la o scindare prealabilă a lanțurilor α în fragmente de lanț, se determină ordinea acestor fragmente de-a lungul catenei respective și apoi se scindează câte un aminoacid de la un capăt al unui segment de lanț și se identifică pe rând, aplicându-se metoda Edmann, care se bazează pe reacția dintre fenilzotiocianat cu grupa NH_2 terminală, la temperatura de 40°C și $\text{pH}=8-9$ [21].

Fracționarea lanțurilor α , separate și izolate din molecula de colagen, poate fi făcută cu bromură de cianogen, cu hidroxilamină sau prin digestie limitată cu colagenază [80] (vezi cap. 11).

Scindarea cu bromură de cianogen. Metoda a fost dată de Witkop și aplicată de către Bornstein și Piez [81, 82].

Bromura de cianogen scindează selectiv lanțul polipeptidic la carbonul din grupa peptidică de la metionină. Reacția are loc în mediu acid, în soluție de 1N acid clorhidric sau acid formic de 70%. Randamentul de scindare este de 80–90%. Mecanismul de reacție este redat în figura 12.11. [83].

Această metodă de scindare, cu o largă aplicare, are următoarele avantaje: BrCN este volatilă și poate fi folosită în exces, mediul acid (acid clorhidric sau formic) se îndepărtează ușor prin liofilizare și unicul produs

secundar, tiocianatul de metil, este ușor volatil și se îndepărtează prin liofilizare [84].

Bromura de cianogen scindează colagenul începând cu capătul C-terminal. În cazul când molecula de colagen nu este denaturată în prealabil, scindarea se oprește după îndepărtarea domeniului telopeptidic nehelicoidal.

Separarea peptidelor obținute prin scindarea cu bromură de cianogen se realizează prin cromatografia cu schimbători de ioni (fosfat-celuloză sau carboximetilceluloză).

Pentru purificarea și determinarea greutatei moleculare a segmentelor de lanț rezultate, acestea se aplică pe sită moleculară (dextran poliacrilamidă și geluri de agar-agar) [85].

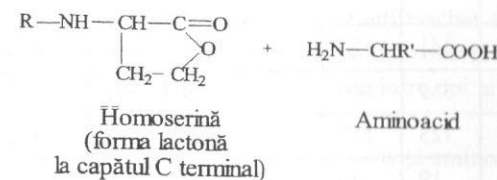
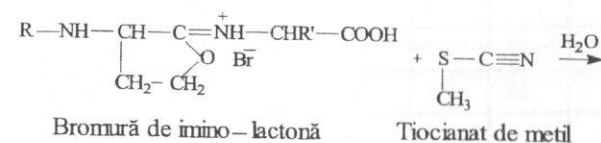
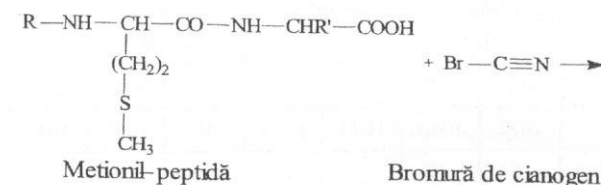


Fig.12.11. Scindarea cu bromură de cianogen

Denumirea peptidelor rezultate s-a preluat după denumirea scindatelor din colagenul din piele sau tendoane de șobolan. Ele au fost denumite în conformitate cu originea lanțului și le-au fost atribuite numere în ordinea în care au apărut în eluatul din coloana de carboximetilceluloză.

În toate cazurile, lanțurile α_1 dau la scindarea cu bromură de cianogen 7-9 peptide, iar lanțurile α_2 dau șase peptide.

Compoziția în aminoacizi a colagenului solubil din pielea de om este dată în tabelele 12.11. și 12.12.

Scindarea cu hidroxilamină (H_2NOH). Modul de acțiune a hidroxilaminei, după Bornstein, se poate explica astfel: se formează un ciclu succinimidic, cu eliminarea unei molecule de amoniac, între grupa amidică primară nesubstituită a asparaginei și hidrogenul de la grupa peptidică a glicinei.

Prin adiția succesivă a doi moli de hidroxilamină, mai întâi la ciclul succinimidic format inițial, iar apoi la cel N-hidroxisuccinimidic rezultat din produsul ciclic al primei adiții, sistemul ciclic se rederchide, scindându-se în același timp și lanțul polipeptidic, cu formare de fragmente care au o verigă C-terminală de acid asparagomonohidroxamic în cele două structuri izomere ale sale.

Tabelul 12.11.

Compoziția în aminoacizi a segmentelor din lanțul α_1 , scindate cu BrCN din pielea de om.

Aminoacidul	α_1CB1	α_1CB2	α_1CB3	α_1CB4	α_1CB5	α_1CB6	α_1CB7	α_1CB8
3-Hipro	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9	0,0	0,0
4-Hilys	0,0	5,6	15,0	6,0	3,0	15,0	26,0	29,0
Asp	1,0	0,0	6,0	3,0	3,0	8,0	12,0	9,0
Thr	1,0	0,0	0,0	1,0	0,0	4,0	5,0	6,0
Ser	3,0	2,0	3,0	0,0	2,0	10,0	10,0	9,0
Glu	2,0	4,0	15,0	3,0	3,0	12,0	17,0	19,0
Pro	2,0	6,0	15,0	6,0	2,1	32,0	39,0	31,0
Gly	4,0	12,0	49,0	16,0	12,0	62,0	90,0	89,0
Ala	0,0	2,0	21,0	3,0	4,0	19,0	35,0	33,0
Val	1,0	0,0	4,0	0,0	0,0	4,0	5,0	6,0
Ile	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	3,0	1,0
Leu	1,0	1,0	3,0	2,0	1,0	4,0	4,0	4,0

Tyr	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Phe	0,0	1,0	3,0	0,0	1,0	2,0	3,0	3,0
Hilys	0,0	0,0	0,3	0,0	1,4	1,5	0,6	1,0
Lys	0,0	0,0	0,3	0,0	1,4	1,5	0,6	1,0
His	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	1,0	0,0	0,0
Arg	0,0	1,0	6,0	4,0	1,0	11,0	13,0	14,0
Homoserină	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Total	19,0	36,0	141,6	45,0	36,9	190,9	264,0	256,0
Total general = 989,4								

Tabelul 12.12.

Compoziția în aminoacizi a segmentelor din lanțul α_2 , scindate cu BrCN din pielea de om.

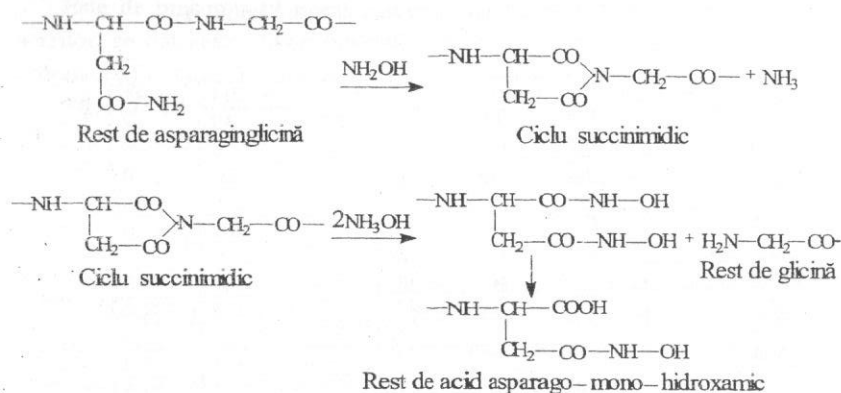
Aminoacidul	α_1CB0	α_1CB1	α_1CB2	α_1CB3	α_1CB4	α_1CB5
3-Hipro	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9	0,8
4-Hilys	0,0	0,0	3,0	28,0	32,0	27,0
Asp	0,0	1,0	2,0	15,0	11,0	15,0
Thr	0,0	0,0	0,0	6,0	6,0	6,0
Ser	0,0	0,0	2,0	10,0	12,0	11,0
Glu	0,0	1,0	1,0	22,0	22,0	21,0
Pro	0,0	1,7	3,0	38,0	33,0	38,0
Gly	1,0	5,0	10,0	107,0	107,0	109,0
Ala	0,0	0,0	3,0	37,0	38,0	32,0
Val	0,0	0,0	0,0	4,0	4,0	6,0
Leu	1,0	1,0	1,0	7,0	12,0	10,0
Tyr	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Phe	0,0	0,0	0,0	4,0	4,0	3,0
Hilys	0,0	0,0	0,0	1,8	4,2	2,9
Lys	0,0	0,8	0,0	9,1	5,5	6,1
Arg	0,0	0,0	3,0	17,0	16,0	16,0
Homoserină	3,0	14,0	30,0	316,0	332,0	327,0
Total	3,0	10,5	28,0	305,0	308,9	306,8
Total general = 962,1						
Masă molec.	289	1347	2748	27500	29300	29900
Total general = 91084						

Ciclul succinimidic se formează în mediu alcalin. În prezența hidroxilaminei au loc, în continuare, două reacții care concurează la desfacerea acestui ciclu, una de hidroliză bazică care desface ciclul, dar nu scindează

lanțul polipeptidic și un atac nucleofil al hidroxilamnei care desface ciclul și scindează lanțul polipeptidic, formând acid hidroxamic [86, 87, 88, 89].

În măsura în care s-a produs hidroliza bazică a ciclului succinimidic, atacul nucleofil al hidroxilamnei nu mai este posibil.

Bornstein se bazează în propunerile sale pe faptul că la capătul C-terminal al scindatelor cu hidroxilamină, se află un rest de asparagină, iar la capătul N-terminal un rest de glicină:



Gallop, în studiile sale privind scindarea colagenului cu hidroxilamină, a lucrat cu collagen de vițel și scindarea a făcut-o cu o soluție de 1 N de NH_2OH , la temperatura de 40°C , $\text{pH}=10$, timp de 4 ore. În primele 40 de minute masa moleculară a lanțurilor polipeptidice a scăzut de la circa 100000 la 20000, fără să apară grupe aminice noi.

În faza următoare, masa moleculară a fragmentelor de lanț a scăzut și au apărut noi grupe aminice, prin scindarea legăturilor peptidice. În prima fază a reacției, fiecărui fragment cu greutate moleculară de 20000, îi corespunde un acid hidroxamic, iar în a doua fază, numărul acizilor hidroxamici scade în raport cu numărul fragmentelor de lanț.

Scindarea cu enzime. Colagenul este foarte rezistent la acțiunea de degradare a enzimelor. Singura enzimă capabilă să degradeze colagenul nativ, în

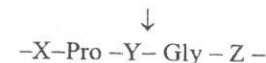
condiții fiziologice de pH și temperatură este *colagenaza bacteriană* sau *clostridiopeptidaza A* care a fost izolată din variatele tulpini de *Clostridium* (*Clostridium Histolyticum*, *Clostridium Perfringens* tip A).

Familia *bacillaceae* cuprinde toate bacteriile sporulate, care se încadrează în două genuri: *genul Clostridium* ce include bacili sporulați anaerobi și *genul Bacillus* care include bacili sporulați aerobi.

Genul *Clostridium* cuprinde toți sporulații anaerobi și microaerofili, aproximativ 93 de specii. Toate aceste specii produc enzime proteolitice, dar numai un număr restrâns sunt *colagenaze*, care atacă colagenul nativ la valori de temperatură și pH fiziologice.

Colagenaza este o enzimă cu mare specificitate. Ea nu hidrolizează proteinele globulare ca hemoglobina, albumina, cazeina și nici pe cele fibrilare ca elastina, keratina sau fibroina.

Colagenaza hidrolizează legătura peptidică formată la partea N-terminală a unui rest de glicină în imediata vecinătate a unui rest de prolină sau hidroxiprolină:



unde X, Y și Z sunt resturi ale diferiților aminoacizi. Dacă resturile de prolină și hidroxiprolină sunt substituite cu N-metilglicină (sarcosină, compusul de bază al creatinei), viteza reacției de hidroliză este mult diminuată.

Peptidele rezultate după hidroliza colagenului posedă întotdeauna în partea lor N-terminală un rest de glicină, iar la extremitatea C-terminală poate fi identificat, în majoritatea cazurilor, un rest de hidroxiprolină. În urma hidrolizei cu colagenază a colagenului rezultă tripeptide de tipul: —Gly—Pro—X— , în care X este oricare aminoacid din colagen.

Orehovici și colaboratorii au arătat că molecula de colagenază prezintă o structură cuaternară cu o masă moleculară de 105000, care poate disocia cu formarea a patru unități inactive, fiecare cu o masă moleculară de aproximativ 25000.

Scindarea colagenului cu colagenază și-a găsit o largă utilizare la determinarea secvenței aminoacizilor din lanțurile polipeptidice ale colage-

nului.

Există și alte enzime, care pot degrada colagenul nativ, fără a răspunde în totalitate performanțelor adevăratelor collagenaze. Astfel, sunt enzime nebacteriene extrase din larvele de tăun (*Hipoderma bovis*) și larvele de muscoid (*Lucilia sericata*); de asemenea, s-au izolat enzime de tip collagenază din diferitele țesuturi și organe (pancreas, ficat), din otrava de șarpe, din coada de mormoloc de broască etc.

Sunt o serie de enzime, numite *enzime nespecifice*, care acționează asupra colagenului denaturat, iar asupra colagenului nativ acționează cu scindarea telopeptidelor de la capetele lanțurilor polipeptidice ale procologenului.

Dintre enzimele nespecifice ale colagenului sunt: *tripsina*, α -*chimotripsina*, *catepsina*, *papaia*, *ficina* și *bromelina*.

Tripsina provine din pancreas, are masa moleculară 24000, domeniul optim de acțiune la pH=8, iar specificitatea sa este :



La tratarea cu tripsină a colagenului denaturat, ar trebui să rezulte 270 de peptide. Practic, s-a constatat că se obțin mult mai puține. L. Grin și W. Grasmann au constatat că prolina și hidroxiprolina ar proteja hidroliza legăturii peptidice. Kühn și colab. au constatat că în funcție de cantitatea de tripsină utilizată se rup legăturile intermoleculare și intramoleculare din colagenul denaturat, precum și legăturile laterale ale colagenului de tip esterice și glicozidice. Tripsina ca și α -chimotripsina scindează telopeptidele procologenului.

α -*Chimotripsina* provine din pancreas, are masa moleculară 25000 și activitatea optimă la pH=8. α -Chimotripsina hidrolizează, în principal, legătura peptidică de la capătul C-terminal al tirozinei, fenilalaninei și triptofanului și în mică măsură în dreptul metioninei și leucinei.

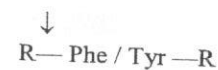
Pepsina a fost izolată din suc gastric al vertebratelor, în deosebi al unor animale domestice (porcine, ovine, bovine), al păsărilor (pui de găină), al unor specii de pești (rechin, morun) și din suc gastric uman și s-a constatat că este diferită (stabilitate, structură și compoziție chimică, specificitate de

substrat etc.) de la o specie la alta [90, 91].

Pepsina este elaborată de mucoasa stomacală sub forma unui precursor denumit pepsinogen (masa moleculară 39000).

Pepsinogenul, la pH<5 trece în cursul unei reacții autocatalitice, cu caracter de proteoliză limitată, în pepsină (masa moleculară de aproximativ 35000). Pepsina este electronegativă, are $pH_i = 1$, are optimul de acțiune la pH=1–2, este formată dintr-un singur lanț polipeptidic, conține resturi de aminoacizi monoaminodicarboxilici, resturi de aminoacizi cu caracter hidrofob, resturi de prolina, hidroxiaminoacizi, mai ales serină. Pepsina și pepsinogenul sunt inactivate în mediul alcalin.

Ca și tripsina și α -chimotripsina, pepsina nu hidrolizează colagenul nativ, dar scindează telopeptidele (propeptidele) procologenului. Pepsina hidrolizează legăturile peptidice în partea C-terminală de la fenilalanina și tirozina din lanțurile polipeptidice ale colagenului denaturat :



Pepsina este o enzimă proteolitică care pe lângă activitatea proteazică are și activități peptidazice, esterazice și transpeptidazice [92].

Catepsinele, enzime intracelulare, cuprind numeroase peptidaze: aminopeptidaze, carboxipeptidaze, di- și tripeptidaze, prolinaze etc., existente în lizozomii celulei și implicate în procesele de autoliză. Sursele cele mai bogate în astfel de enzime sunt rinichiul, splina, ficatul și plămânii.

„In vitro”, pH-ul optim de acțiune al catepsinelor este la valoarea de 3–4, rar întâlnit în țesutul conjunctiv, „in vivo”.

Catepsinele acționează asupra colagenului denaturat ca și la scidarea telopeptidelor procologenului.

Enzimele vegetale, *papaia* (din latexul arborelui de pepene – *Carica papaya*), *chimopapaia* (latexul fructelor de *Carica papaya*), *ficina* (latexul de smochin) și *bromelina* (din ananas), au mase moleculare de 25000–30000 și acțiune optimă la pH=6,5–9,5. Au fost puțin studiate cu privire la acțiunea lor asupra colagenului.

*
* *
* *

Un lanț polipeptidic din procologen este format din două tipuri diferite de secvențe: regiunea helicoidală de 1000–1050 aminoacizi, în care fiecare a treia poziție este ocupată de glicină și regiunile N- și C-terminale, care nu prezintă acest tip de regularitate a aminoacizilor, ambele regiuni terminale fiind formate din lanțuri nehelicoidale, numite telopeptide sau propeptide și conțin aminoacizi cu sulf ca cisteina, precum și triptofan, de asemenea, lizină, hidrolizină, hidroxiprolină, care formează legături transversale, ce contribuie la stabilizarea triplului helix; telopeptidele conțin 50–100 aminoacizi.

În anul 1975, Peter P. Fietzek și Klaus Kühn au publicat secvența completă a aminoacizilor dintr-un lanț α_1 al moleculei de collagen tip I, din pielea de vițel (Fig.12.12.) [93 – 98]:

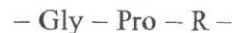
Glu-Leu-Ser-Tyr-Glu-Tyr-Asp-Glu-Lys-Ser-Thr-Gly-Ile-Ser-Val-Pro-	16
Gly-Pro-Met-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Arg-Gly-Leu-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Ala-Hyp-	18
Gly-Pro-Gln-Gly-Phe-Gly-Gly-Pro-Hyp-Gly-Glu-Hyp-Gly-Glu-Hyp-Gly-Ala-Ser-	36
Gly-Pro-Met-Gly-Pro-Arg-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Lys-Asn-Gly-Asp-Asp-	54
Gly-Glu-Ala-Gly-Lys-Pro-Gly-Arg-Hyp-Gly-Gln-Arg-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Gln-	72
Gly-Ala-Arg-Gly-Leu-Hyp-Gly-Thr-Ala-Gly-Leu-Hyp-Gly-Met-Hyl-Gly-His-Arg-	90
Gly-Phe-Ser-Gly-Leu-Asp-Gly-Ala-Lys-Gly-Asn-Ala-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Lys-	108
Gly-Glu-Hyp-Gly-Ser-Hyp-Gly-Glu-Asn-Gly-Ala-Hyp-Gly-Gln-His-Gly-Pro-Arg-	126
Gly-Leu-Hyp-Gly-Glu-Arg-Gly-Arg-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Ser-Ala-Gly-Ala-Arg-	144
Gly-Asp-Asp-Gly-Ala-Val-Gly-Ala-Ala-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Thr-Gly-Pro-Thr-	162
Gly-Pro-Hyp-Gly-Phe-Hyp-Gly-Ala-Ala-Gly-Ala-Lys-Gly-Glu-Ala-Gly-Pro-Gln-	180
Gly-Ala-Arg-Gly-Ser-Glu-Gly-Pro-Gln-Gly-Val-Arg-Gly-Glu-Hyp-Gly-Pro-Hyp-	198
Gly-Pro-Ala-Gly-Ala-Ala-Gly-Pro-Ala-Gly-Asn-Hyp-Gly-Ala-Asp-Gly-Gln-Hyp-	216
Gly-Ala-Arg-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Gln-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Hyp-Gly-Pro-Lys-	234
Gly-Asn-Ser-Gly-Glu-Hyp-Gly-Ala-Hyp-Gly-Asn-Lys-Gly-Asp-Thr-Gly-Ala-Lys-	252
Gly-Glu-Hyp-Gly-Pro-Ala-Gly-Val-Gln-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Ala-Gly-Glu-Glu-	270
Gly-Lys-Arg-Gly-Ala-Gly-Hyp-Gly-Pro-ser-Gly-Leu-Hyp-Gly-Pro-Hyp-	288
Gly-Glu-Arg-Gly-Gly-Hyp-Gly-Ser-Arg-Gly-Phe-Hyp-Gly-Ala-Asp-Gly-Val-Ala-	306
Gly-Pro-Lys-Gly-Pro-Ala-Gly-Glu-Arg-Gly-Ser-Hyp-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Lys-	324
Gly-Ser-Hyp-Gly-Glu-Ala-Gly-Arg-Hyp-Gly-Glu-Ala-Gly-Leu-Hyp-Gly-Ala-Lys-	342
Gly-Leu-Thr-Gly-Ser-Hyp-Gly-Ser-Hyp-Gly-Pro-Asp-Gly-Lys-Thr-Gly-Pro-Hip-	360
Gly-Pro-Ala-Gly-Glu-Asn-Gly-Arg-Hyp-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Hyp-Gly-Ala-Arg-	378
Gly-Gln-Ala-Gly-Val-Met-Gly-Phe-Hyp-Gly-Pro-Lys-Gly-Ala-Ala-Gly-Glu-Hyp-	396
Gly-Lys-Ala-Gly-Glu-Arg-Gly-Val-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Ala-Val-Gly-Pro-Ala-	414

Gly-Lys-Asp-Gly-Glu-Ala-Gly-Ala-Gln-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Ala-	432
Gly-Glu-Arg-Gly-Glu-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Ser-Hyp-Gly-Phe-Gln-Gly-Leu-Hyp-	450
Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Hyp-Gly-Glu-Ala-Gly-Lys-Hyp-Gly-Glu-Gln-Gly-Val-Hyp-	468
Gly-Asp-Leu-Gly-Ala-Hyp-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Arg-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Hyp-	486
Gly-Glu-Arg-Gly-Val-Glu-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Arg-Gly-Ala-Asn-	504
Gly-Ala-Hyp-Gly-Asn-Asp-Gly-Ala-Lys-Gly-Asp-Ala-Gly-Ala-Hyp-Gly-Ala-Hip-	522
Gly-Ser-Gln-Gly-Ala-Hyp-Gly-Leu-Gln-Gly-Met-Hyp-Gly-Glu-Arg-Gly-Ala-Ala-	540
Gly-Leu-Hyp-Gly-Pro-Lys-Gly-Asp-Arg-Gly-Asp-Ala-Gly-Pro-Lys-Gly-Ala-Asp-	558
Gly-Ala-Pro-Gly-Lys-Asp-Gly-Val-Arg-Gly-Leu-Thr-Gly-Pro-Ile-Gly-Pro-Hyp-	576
Gly-Pro-Ala-Gly-Ala-Hyp-Gly-Asp-Lys-Gly-Glu-Ala-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Ala-	594
Gly-Thr-Arg-Gly-Ala-Hyp-Gly-Asp-Arg-Gly-Glu-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Ala-	612
Gly-Phe-Ala-Gly-Pro-Hyp-Gly-Ala-Asp-Gly-Gln-Hyp-Gly-Ala-Lys-Gly-Glu-Hyp-	630
Gly-Asp-Ala-Gly-Ala-Lys-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Ala-	648
Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Ile-Gly-Asn-Val-Gly-Ala-Hyp-Gly-Pro-Hyl-Gly-Ala-Arg-	666
Gly-Ser-Ala-Gly-Pro-Hyp-Gly-Ala-Thr-Gly-Phe-Hyp-Gly-Ala-Ala-Gly-Arg-Val-	684
Gly-Pro-Hip-Gly-Pro-Ser-Gly-Asn-Ala-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Ala-	702
Gly-Lys-Glu-Gly-Ser-Lys-Gly-Pro-Arg-Gly-Glu-Thr-Gly-Pro-Ala-Gly-Arg-Hyp-	720
Gly-Glu-Val-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Ala-Gly-Glu-Lys-Gly-Ala-Hyp-	738
Gly-Ala-Asp-Gly-Pro-Ala-Gly-Ala-Hyp-Gly-Thr-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly-Ile-Ala-	756
Gly-Gln-Am-Gly-Val-Val-Gly-Asp-Gly-Gln-Arg-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Hyp-	774
Gly-Leu-Hyp-Gly-Pro-Ser-Gly-Glu-Hyp-Gly-Lys-Gln-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Ser-	792
Gly-Glu-Arg-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Met-Gly-Pro-Hyp-Gly-Leu-Ala-Gly-Pro-Hyp-	810
Gly-Glu-Ser-Gly-Arg-Gly-Gly-Ala-Hyp-Gly-Ala-Glu-Gly-Ser-Hyp-Gly-Arg-Asp-	828
Gly-Ser-Hyp-Gly-Ala-Lys-Gly-Asp-Arg-Gly-Glu-Thr-Gly-Pro-Ala-Gly-Ala-Hyp-	846
Gly-Pro-Hyp-Gly-Ala-Hyp-Gly-Ala-Hyp-Gly-Pro-Val-Gly-Pro-Ala-Gly-Lys-Ser-	864
Gly-Asp-Arg-Gly-Glu-Thr-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Ile-Gly-Pro-Val-Gly-Pro-Ala-	882
Gly-Ala-Arg-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Gln-Gly-Pro-Arg-Gly-Asn-Hyl-Gly-Gly-Thr-	900
Gly-Gln-Gln-Gly-Asn-Arg-Gly-Ile-Hyl-Gly-His-Arg-Gly-Phe-Ser-Gly-Leu-Gln-	918
Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Ser-Hyp-Gly-Glu-Gln-Gly-Pro-Ser-Gly-Ala-Ser-	936
Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Arg-Gly-Pro-Hyp-Gly-Ser-Aqla-Gly-Ser-Hyp-Gly-Lys-Asp-	954
Gly-Leu-Asn-Gly-Leu-Hyp-Gly-Pro-Ile-Gly-Hyp-Hyp-Gly-Pro-Arg-Gly-Arg-Thr-	972
Gly-Asp-Ala-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Pro-Gly-Hyp-Gly-Pro-Hyp-	990
Gly-Pro-Pro-	993
Ser-Gly-Gly-Tyr-Asp-Leu-Ser-Phe-Leu-Pro-Gln-Pro-Pro-Gln-Gln-Gln-Lys-Ala-	18
His-Asp-Gly-Gly-Arg-Tyr-Tyr	7

Fig.12.12. Secvența aminoacizilor din lanțul α_1 a collagenului tip I din piele. Determinările s-au făcut pe collagen din piele de vițel, în afară de regiunea CB8, poziția 124–402, la care determinările s-au făcut pe collagen din piele de șobolan.

De-a lungul catenelor polipeptidice există domenii în care, alături de prolină și hidroxiprolină, se găsesc în proporție mai ridicată aminoacizi nepolari și domenii cu o proporție mai ridicată de aminoacizi polari.

Secvența aminoacizilor din lanțul polipeptidic de colagen este următoarea:



în care, Pro = prolină sau hidroxiprolină și R = un rest de alt aminoacid.

Cele mai dese secvențe din zonele apolare ale lanțurilor polipeptidice sunt de forma: Gly-Pro-Hipro, Gly-Pro-Gly, Gly-Pro-Ala.

Ele conțin 94% din totalul prolinei și 74% din totalul glicinei.

Dacă colagenul nativ este în prealabil denaturat prin creșterea temperaturii, scăderea pH-ului sau adăugarea de substanțe în concentrații nefiziologice, devine susceptibil de a fi atacat și de proteaze nespecifice.

12.3.4. STRUCTURA SECUNDARĂ

În cadrul acestei structuri, se studiază forma unui lanț α -polipeptidic din molecula de colagen.

În anul 1951, Pauling și Corey au arătat că modalitatea cea mai posibilă de îndoire și răsucire a unui lanț α -polipeptidic este cea elicoidală, sub forma unei spirale (α -helix sau *helix minor*), cu răsuciri de la stânga spre dreapta în spre partea N-terminală.

Modelul lui Pauling și Corey are 3,28 aminoacizi într-o spirală, iar distanța între spire este de 5,44Å. În general, pentru structura colagenului este acceptată interpretarea modelului difracției cu raze X a fibrei de colagen reieșită din lucrările lui Ramachandran [99–103].

Difractograma colagenului la raze X, cu unghi mare (Fig.12.13., 12.14.) prezintă arcuri meridionale la 11Å – 7,6Å – 4,5Å – 3Å. Arcul meridional situat la aproximativ 3Å arată că înălțimea reprezentată de proiecția unui aminoacid pe axul helixului este de aproximativ 3Å (2,95 – 3,05Å), în funcție de gradul de întindere a fibrei (arcul meridional indicat cu litera M în figura 12.14.)

La difractograma colagenului, un alt element caracteristic este spotul ecuatorial notat cu E în figura 12.13. situat la 10–15Å (în funcție de gradul de hidratare al fibrei), care este atribuit distanței laterale dintre lanțurile polipeptidice adiacente. Spoturile notate cu D (Fig.12.13) de la 4,4 Å reprezintă dis-

tanța medie dintre planurile grupărilor amidice ($-\text{CO}-\text{NH}-$) din lanțurile polipeptidice din constituția triplului helix a moleculei de colagen.

Lucrările lui Ramachandran au fost dezvoltate de Covan și colab. [104, 105], Bear [106], Rich și Crick [107, 108, 109, 110]. Stabilitatea acestei structuri complexe, a unui lanț α -polipeptidic, se realizează prin legături de hidrogen de tipul $\text{NH}\cdots\text{O}=\text{C}$, între grupele legăturilor peptidice ale aminoacizilor din spirele alăturate. Catenele laterale R ale diferitelor resturi de aminoacizi ies radial din helix (Fig.12.14. și Fig.12.15).

Un lanț de poli-L-prolină are o structură secundară sub formă de helix, foarte asemănătoare cu a lanțurilor polipeptidice colagenice.

De aici s-a dedus că forma de helix a lanțurilor polipeptidice din macromolecula de colagen se datorește particularităților sterice și chimice ale prolinei.

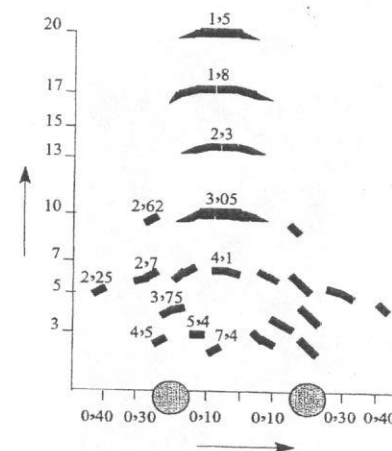


Fig.12.13. Reprezentarea schematică a difractogramei colagenului la raze X cu unghi mare [111].

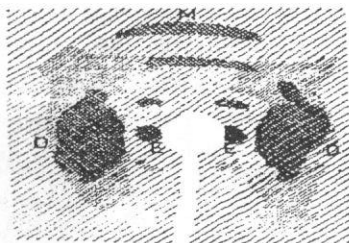


Fig.12.14. Aspectul colagenului la difracția cu raze X, cu unghi mare, utilizând un fascicul de raze cu unghi înclinat. M – arc meridional la 3,05 Å ; D – spoturile difuze 4,4 Å ; E – reflectarea ecuatorială la 10,4 – 15 Å [111].

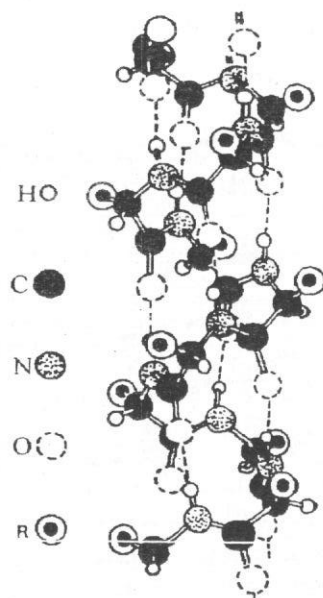


Fig. 12.15. α -Helixuri de colagen

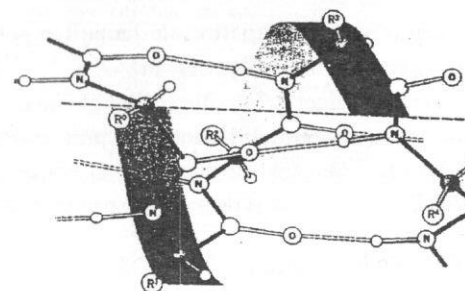


Fig. 12.16. Rotirea helixului de colagen

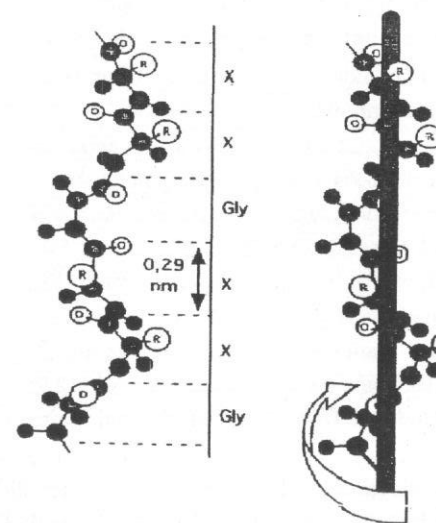


Fig. 12.17. Helix de colagen cu indicarea sensului de rotație.

Lanțurile polipeptidice de colagen, sub formă de helix de stânga, se răsucesc în sus spre capătul N-terminal. Așa cum s-a mai spus, fiecare al treilea

aminoacid din lanț este glicina, lanțul polipeptidic conținând și o cantitate însemnată de prolină și hidroxiprolină.

Contrar a ceea ce se întâmplă în α -he-lixul de collagen, în lanțul de poli-L-prolină nu se găsesc punți de hidrogen între resturile de aminoacizi ale aceluiași helix (Fig.12.16.). El se înalță cu 0,29 nm pentru un rest de aminoacid și are mai puțin de trei resturi de aminoacizi pe spiră, pe când α -helixul de collagen nu se înalță decât cu 0,15 nm pe restul de aminoacid și numără 3,6 resturi pe spiră.

Prolina, într-un lanț polipeptidic, nu are grupa $-NH-$ care participă la formarea de punți de hidrogen și nu are capacitatea de rotație liberă în jurul legăturii C-N, din cauza ciclului pirolidinic.

12.3.5. STRUCTURA TERȚIARĂ

Macromolecula de collagen (*tropocolagenul*) este alcătuită din trei lanțuri α răsucite împreună de la dreapta spre stânga, ca într-o funie, în jurul unui ax comun, realizându-se *triplul helix* sau *helixul major* (Fig.12.18.).

Această structură conferă moleculei de collagen o alură de bastonaș rigid.

Așa după cum s-a arătat, în molecula de collagen de tip I se găsesc două lanțuri α_1 și un lanț α_2 , care se deosebesc între ele prin compoziția de aminoacizi.

Lanțul α_1 conține o cantitate mai mare de hidroxiprolină, prolină, alanină, fenilalanină și lizină, în timp ce acidul asparagic, valina, leucina, izoleucina, hidroxilizina și histidina sunt în cantități mai mici.

Lanțurile polipeptidice ce alcătuiesc molecula de collagen sunt solidarizate prin legături transversale, a căror număr crește progresiv, pe măsura maturării proteinei.

Existența acestui proces de conectare interlanțuri a fost demonstrată prin identificarea în soluțiile de collagen, atât a fracțiilor α cât și a unor fracții β și γ cu greutatea moleculară reprezentând multipli greutatea moleculară caracteristică lanțurilor α . Astfel, tratarea soluțiilor de collagen cu agenți care

rup legăturile de hidrogen (căldura, KI, KBr, KCNS, uree) este urmată de o reducere a rotației optice și a vâscozității intrinseci.

Ultracentrifugarea acestor preparate, ca și a colagenului solubil în acizi, obținut prin tratare cu o soluție tampon de citrat (pH = 1,5–3,5) a evidențiat, pe lângă fracția α cu greutatea moleculară de circa 100000 și o fracție β , cu o greutate moleculară de 200000.

S-a constatat că există mai multe fracții β , care reprezintă dimeri, alcătuiți din variate combinații ale celor două lanțuri α .

Au fost astfel identificați: dimerul β_1 (sinonim $\beta_{1,2}$), care conține un lanț α_1 și un lanț α_2 ; dimerul β_2 (sinonim $\beta_{1,1}$), care conține două lanțuri α_1 și dimerul $\beta_{2,2}$, care conține două lanțuri α_2 .

Fracțiile γ sunt trimeri care conțin trei lanțuri polipeptidice, unite prin legături transversale, γ_{111} , γ_{112} , γ_{122} , γ_{222} , care, ca și în cazul fracțiilor β , indicii 1 sau 2, reprezintă lanțurile α_1 sau α_2 (Fig.12.19.).

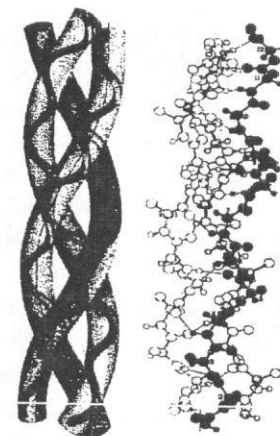


Fig. 12.18. Structura colagenului din trei helixuri de stânga ce se înfășoară împreună de la dreapta la stânga.

Legăturile transversale care se formează între lanțurile α și duc la structurile β și γ sunt de tipul celor arătate la biosinteza colagenului și anume: punți aldolice și aldiminice. Astfel de punți transversale se formează, în special, la capetele lanțurilor.

Cea mai mare parte din legăturile dintre lanțurile polipeptidice ale moleculei de colagen o formează legăturile de hidrogen. La denaturarea colagenului, aceste legături se rup cu ușurință, iar după înlăturarea agentului de denaturare se formează din nou.

S-au făcut diferite propuneri privind structura moleculară a colagenului. Prima a fost a lui Astbury în 1930, apoi a lui Pauling și Corey, Crick și Randall în 1950, Rich și Crick, Ramachandran și Kartha în anul 1955 [102, 108, 112].

Modelele lui Rich și Crick precum și Ramachandran și Kartha sunt foarte asemănătoare și nu diferă între ele decât prin puține detalii, cu privire la numărul legăturilor de hidrogen [92, 113].

Modelul lui Rich și Crick include o singură legătură de hidrogen pentru fiecare trei resturi de aminoacizi. Cele două variante ale acestui model diferă prin modul de aranjare posibil a grupei hidroxilice a hidroxiprolinei: în "Colagen I" gruparea hidroxilică este îndreptată înspre axul tripulului helix, participând la conectarea intramoleculară a celor trei lanțuri polipeptidice; în Colagen II", gruparea hidroxil a hidroxiprolinei este orientată radial, în afara tiplului helix și participă la conectarea intermoleculară cu triplu helixuri adiacente.

Modelul Ramachandran și Kartha include în structura "Standard", două legături de hidrogen pentru fiecare trei resturi de aminoacizi.

Această structură "Standard" poate exista numai în zonele macromoleculei unde, în secvența caracteristică a colagenului, Gli-X-Y, prolina și hidroxiprolina nu apar împreună în pozițiile X și Y. În regiunile unde apar secvențe Gli-Pro-Hipro, atomul de azot al inelului pirolidinic nu are atomi de hidrogen disponibili pentru construirea unei punți.

În figura 12.20. este prezentată structura propusă de Ramachandran și Kartha.

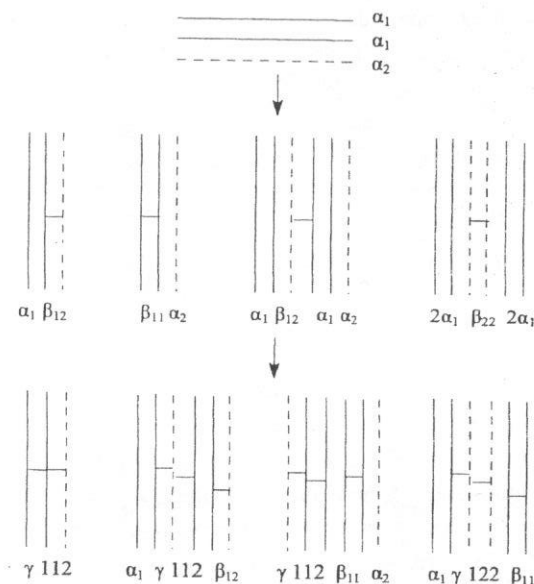


Fig.12.19. Reprezentarea diagramică a stadiilor diferite de formare a legăturilor transversale între lanțurile polipeptidice ale macromoleculei de colagen.

În figură este reprezentată proiecția unui triplu helix într-un plan perpendicular pe axa fibrei. Lanțul A este un helix cu simetrie de trei spire și aceasta se repetă în lanțurile B și C, fiecare având trei spire în jurul axului central al triplului helix. Se constată din această diagramă că atomul de carbon α , $C_{\alpha 1}$, din lanțul A, nu poate avea decât doi atomi de hidrogen atașați, (cazul glicinei) și că atomul de hidrogen nu poate fi înlocuit cu C_{β} . Dacă apare un atom C_{β} în această poziție, el este prea aproape de atomul $C_{\alpha 1}$ din lanțul B și cele trei lanțuri nu vor putea fi împachetate strâns. De aici se trage concluzia

că glicina este o necesitate absolută pentru structură și trebuie să apară la fiecare a treia poziție, în forma secvențială —Gly—X—Y—.

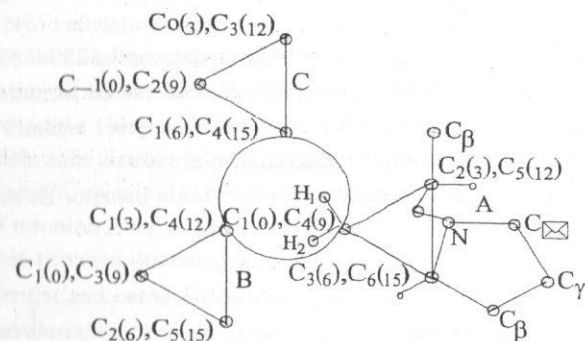


Fig.12.20. Proiecția unui triplu helix în plan vertical pe axa fibrei.

Așa după cum s-a arătat mai sus, a existat o controversă în ceea ce privește structura moleculei de colagen între modelul lui Rich și Crick și cel al lui Ramachandran și Kartha asupra numărului legăturilor de hidrogen.

Se formează o singură legătură de hidrogen pentru fiecare trei resturi de aminoacizi (Rich și Crick) sau două legături de hidrogen (Ramachandran și Kartha) ?

Studiile ulterioare au arătat că există două grupări NH pentru fiecare trei resturi de aminoacizi care sunt legate prin legături de hidrogen. Cea de a doua legătură de hidrogen între un NH și CO al unui lanț vecin nu se formează direct, ci prin intermediul unei molecule de apă (Fig.12.21.) [92].

Unitățile peptidice din lanțuri sunt marcate prin linii care unesc atomii de carbon α . Numerele indică înălțimea atomilor de carbon α , în Å, în cele trei lanțuri A, B, C. Atomii de hidrogen H_1 și H_2 sunt atașați la atomii de carbon α , C_1 , iar atomii de carbon β , în configurația L (marcați cu C_β) pot fi ușor atașați la atomii de carbon α , C_2 și C_3 . Inelul pirolidinic al restului de prolină este atașat la atomul C_3 într-un lanț (marcat C_α , C_β , C_γ , N) [113].

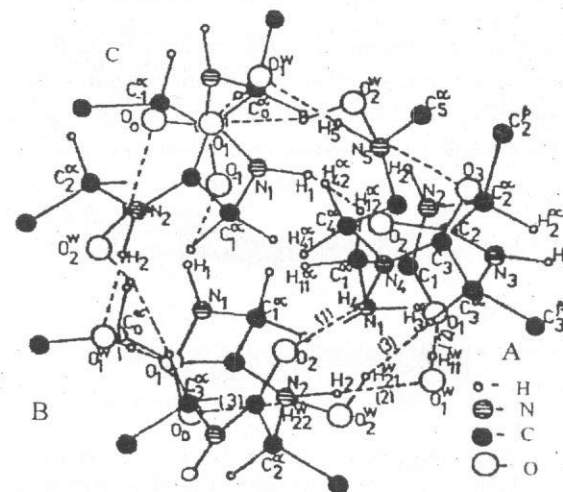


Fig.12.21. Structura cu punți de apă propusă de Ramachandran și Chandrasekaran. Se remarcă, de exemplu, că la N_1H_1 a lanțului B, hidrogenul este direct legat de oxigenul de la carbonul din lanțul C, iar N_2H_2 are hidrogenul legat la molecula de apă OW_1 , care în întoarcere se leagă la oxigenul de la carbonul din lanțul A.

Această structură cu punți de apă servește la explicarea rolului îndeplinit de hidroxiprolină în structura colagenului. Examinându-se poziția moleculei de apă în structura cu punți de apă, s-a găsit că ea poate fi legată, de asemenea, prin intermediul unei legături de hidrogen cu grupa OH a hidroxiprolinei.

Examinând molecula de apă din figura 12.21., se constată că numai unul dintre protonii ei acționează ca donor pentru o legătură de hidrogen, de la o grupă NH. De aceea, al doilea proton al apei este liber și acesta se poate lega prin intermediul unei legături de hidrogen cu un atom de oxigen al hidroxiprolinei. Astfel, în condiții convenabile, hidroxiprolina colagenului poate servi drept receptor de legături de hidrogen și prin aceasta, poate stabiliza structura colagenului.

Datorită complexității structurii proteinelor, spectrele lor în IR reprezintă benzi largi, întinse și nediferențiate. Există însă anumite regiuni caracteristice (pentru grupele peptidice) ce apar la toate proteinele și care pot da informații referitoare la structura secundară și asocierea catenelor polipeptidice [114, 115].

Tabelul 12.13.

Benzi de absorbție în IR pentru peptide și proteine

Banda de absorbție	Frecvența aproximativă, 1/cm	Descrierea
Amidă A	3330 – 3180	Întindere N – H
Amidă B	3100 – 3060	Deformare armonică N – H
Amidă I	1680 – 1590	Întindere C – O
Amidă II	1580 – 1480	Deformare N – H și întindere C – N
Amidă III	1300 – 1250	Întindere C – N și deformare N – H
Amidă V	800 – 600	Deformare în afara planului N – H

Tabelul 12.14

Funcții ale benzilor de absorbție

Funcția	Frecvența, cm ⁻¹	Domeniul
Vibrații de alungire N – H	3550 – 3420	pentru NH ₂ liber
	3500 – 3100	pentru NH – asociat
	3400 – 3300	pentru = N – H
Vibrații de deformare N – H	1645 – 1550	pentru – NH ₂
	1580 – 1510	pentru – NH –
Vibrații de alungire C = O	1650 – 1620	în amide
	1740 – 1650	în acizi
Vibrații de alungire O – H	3730 – 3520	pentru O – H liber
	3520 – 3100	pentru O – H asociat

La proteine și polipeptide, în spectrul IR, sunt caracteristice următoarele benzi de absorbție: amidă A, amidă B, amidă I, II, III, IV, V, VI și VII. Se recunosc mai ușor benzile date în tabelul 12.13.

Banda de absorbție de la 3400 cm⁻¹ este caracteristică vibrației de întindere O–H.

Chirdadze Z.U.N. [116] arată că absorbția în domeniul 3290–3330 cm⁻¹ este caracteristică pentru vibrația de valență N–H, asociată cu formarea legăturii de hidrogen, iar în domeniul 3460 cm⁻¹ pentru aceeași legătură neasociată, însă, la formarea legăturilor de hidrogen.

Miayzawa T. [117] prezintă următoarele funcții ale benzilor de absorbție prezentate în tabelul 12.14.

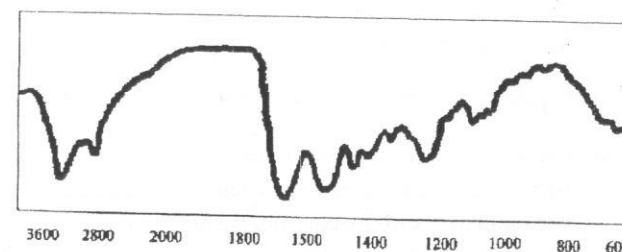


Fig.12.22. Spectrul în IR a colagenului nativ

Spectrul în IR al colagenului nativ, la umiditatea zero, se prezintă în figura 12.22.

12.3.6. STRUCTURA CUATERNARĂ

Modul de constituire și creștere a fibrilelor de colagen rămâne una dintre cele mai importante probleme biologice legate de colagen, având implicații în procesele de formare a țesutului conjunctiv, atât în condiții normale, cât și patologice [118, 119].

Contribuții fundamentale la agregarea macromoleculelor de colagen în fibrile au fost aduse de studiile asupra precipitării colagenului din soluție. Aceste investigații au sugerat că fibrilogeneza implică două etape:

– agregarea unidimensională a macromoleculelor de colagen printr-un proces de polimerizare liniară, ducând la apariția protofibrilelor, structuri cu diametrul de 15 Å și de lungime variabilă;

— agregarea laterală a protofibrilelor sau a macromoleculelor de colagen, de-terminând apariția fibrilelor, fibrelor, fasciculelor de fibre.

Agregarea unidirecțională. Protofibrila. Unirea macromoleculelor de colagen, prin capetele lor, formează o înlănțuire, denumită *protofibrilă*. Numeroase studii au arătat că la această unire participă porțiuni nehelicoidale ale lanțurilor polipeptidice, denumite *propeptide* sau *telopectide*.

Prin digestia colagenului nativ cu enzime proteolitice, propeptidele sau telopectidele sunt distruse în primul rând.

Substanțele proteice hidrolizate pe cale enzimatică nu conțin hidroxi-prolină și treonină și se remarcă prezența unui conținut mai mare de tirozină (majoritatea tirozinei din colagen este localizată în telopectide). De asemenea, s-au evidențiat trei cetoacizi: acidul piruvic, acidul α -ceto-glutaric și acidul α -ceto-izovalerianic. Grupele carbonil ale acestor acizi participă la formarea legăturilor transversale [120, 121, 122].

Telopectidele reprezintă aproximativ 5% din conținutul proteic al moleculei de colagen (a tropocolagenului). Ele sunt fragmente ale lanțurilor α , formate din cel mult 100 aminoacizi și au formă dreaptă, nehelicoidală [123].

Agregarea laterală. Fibrila de colagen. Mai multe protofibrile formează fibrila de colagen. Fibrilele au diametre ce variază în diferite țesuturi și stadii de dezvoltare de la 150 Å la 2000 Å.

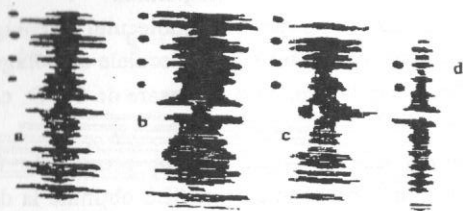


Fig. 12.23. Aspectul difractogramei cu raze X, cu unghi mic, pentru: a. fibrilă de colagen uscată, b. fibrilă de colagen uscată și colorată cu acid fosfotungstenic, c. fibrilă de colagen tăbăcită în crom și uscată, d. fibrilă de colagen umedă.

Difracția cu raze X la unghi mic a arătat că există discontinuități de structură de-a lungul fibrelor de colagen. În figura 12.23. se observă arcurile meridionale la perioade egale cu 640–700 Å. Microscopia electronică confirmă această periodicitate drept una din principalele particularități ale fibrelor native de colagen (Fig. 12.24.).

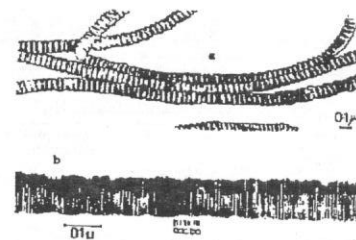


Fig. 12.24. Aspectul electronomicroscopic al fibrei de colagen. a. Umbrire cu crom, b. Colorare cu acid fosfotungstenic.

Prin colorare cu acid fosfotungstenic, s-a observat, de-a lungul unei perioade de 640 Å, existența a 5–6 striații transversale sau chiar mai multe.

Diferite forme fibrilare pot fi obținute din soluțiile diluate de colagen.

Diferențele structurale observate la microscopul electronic se datoresc condițiilor în care au fost precipitate. La modificarea pH-ului, a tăriei ionice, a temperaturii, datorită adăugării unor agenți nespecfici, asemenea ATP sau condroitin sulfatului, colagenul poate fi precipitat în anumite stări fibroase, care sunt predominant determinate de forțele electrostatice.

Diferitele forme de precipitare ale colagenului din soluție, ilustrate în figura 12.25. [12, 113], în anumite condiții de pH, tărie ionică și adăugarea unor agenți nespecfici, se obțin structuri de tip nativ sau cu alt mod de agregare:

- fibrile de tip nativ, în care moleculele de colagen sunt orientate paralel, dar deplasate cu 1/4 din lungimea lor (periodicitate de 640 Å);
- fibrilele de tip FLS, fibrile cu perioadă alungită (*fibrous long spacing*), în care moleculele agregate liniar antiparalel au perioada de 2800 Å și sunt formate prin adăugarea de α -glicoproteină la soluția de colagen;

— segmentele cu perioadă alungită (*segments long spacing*), tip SLS, în care moleculele sunt agregate numai lateral, au perioada de 2800 Å și sunt formate prin adiție de ATP în soluția de collagen.

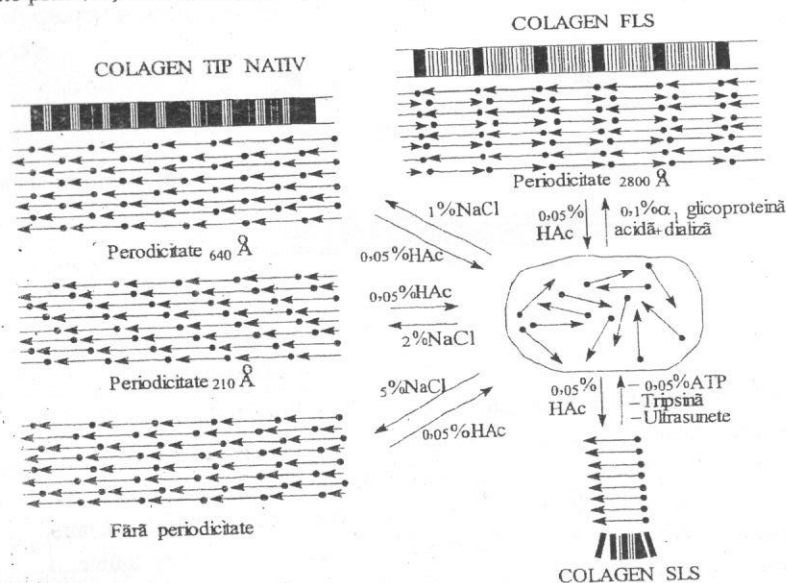


Fig.12.25. Diagrama reprecipitării collagenului din soluții în variate forme de agregare.

a. Fibrile de tip nativ, în care moleculele de collagen sunt orientate paralel, dar deplasate cu anumite procente din lungimea lor (periodicitatea de 640 Å); b.

Segmentele cu perioadă alungită pot fi considerate ca **amprenta moleculară a collagenului**. Aspectul electronmicroscopic al acestor segmente demonstrează că striatiile sunt determinate de distribuția neuniformă a aminoacizilor polari.

Forțele de coeziune electrostatice constituie principalul mecanism de agregare laterală. Interacțiunea electrostatică cea mai intensă, la pH neutru, apare când moleculele se suprapun cu anumite procente din lungimea lor și sunt decalate cu 1/3 din lungimea lor unele față de altele.

Același lucru se petrece și în soluțiile acide de collagen, unde sunt disociate grupele bazice în echilibru cu ioni acizi din soluții. Prin adăugarea de ATP, acesta înlocuiește ionul acid al solventului și astfel se precipită moleculele de collagen.

Ionul ATP fiind un ion multiplu, va lega sarcini pozitive de intensitate egală de pe două molecule adiacente. În acest fel agregarea laterală se realizează prin orientarea paralelă cu grupele polarizate similar, situate la același nivel. Astfel se obțin segmente cu perioadă alungită.

Hodge, Petruska și Bailey [113] au constatat că protofibrilul de collagen are o periodicitate intrinsecă de 4 D, unde D se referă la repetarea perioadei în care s-a observat o bandă majoră de luminozitate și o bandă majoră întunecată la examinarea cu microscopul electronic a collagenului.

Petruska și Hodge au determinat lungimea moleculei de colagen la 4,4 D. Ei au presupus că la formarea protofibrilelor moleculele de colagen trebuie să se suprapună longitudinal, cap la cap, cu o deplasare de 0,4 D, care este cam de 10% din lungimea moleculară.

Acest grad de suprapunere moleculară este prezent la finbrilele de colagen de tip nativ ca și în cazul segmentelor SLS obținute la dializa contra apei, după aditia ATP, a unei soluții acide de colagen.

În structura fibrilelor de tip nativ hidratate, distanțele între moleculele de colagen așezate cap la cap trebuie să fie de $0,6 D$ (aproximativ $400 \text{ \AA}$).

Reprezentarea bidimensională a aranjamentului de împachetare a moleculelor de colagen de tip nativ este prezentată în figura 12.26.

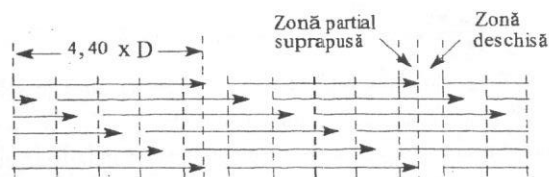


Fig.12.26. Reprezentarea bidimensională a dispunerii împachetării moleculelor de colagen în fibrilele de tip nativ. Deplasarea longitudinală în apropierea vecinilor la distanță D , rezultă la formarea fibrilului o perioadă D .

Cu fiecare perioadă se include o zonă parțial suprapusă de $0,4 D$ și o zonă deschisă de $0,6 D$ (Hodge, [113]).

Se menționează, de asemenea, că moleculele de tropocolagen se asamblează cap la cap, cu un decalaj de $640 \text{ \AA}$ și prin legături transversale aldolice și aldiminice. Lizina din partea N-terminală a unor molecule se leagă covalent de alte unități de lizină ale părții C-terminale ale unei molecule vecine prin acțiunea liziloxidazei (Fig. 12.27).

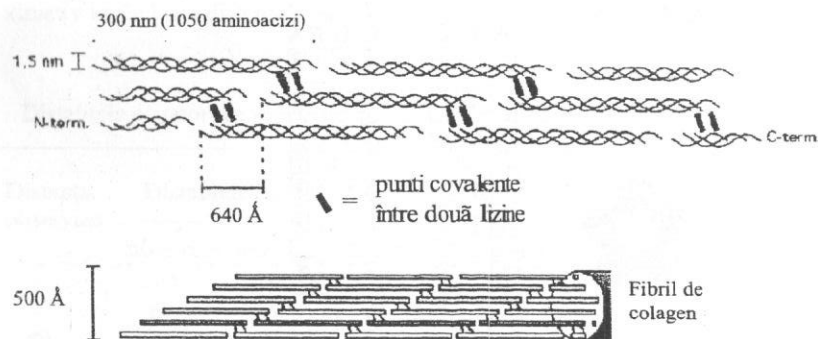


Fig.12.27. Formarea fibrililor prin asamblarea cap la cap a moleculelor de colagen prin legături aldolice și aldiminice.

În cursul formării fibrilelor se produce o ușoară răsucire a lor. Odată atins un anumit diametru al fibrilelor, acesta nu se mai modifică din considerente energetice.

Grosimea maximă a fibrilelor este de $1000 \text{ \AA}$, iar unitățile structurale imediate, denumite subfibrile, au diametrul de $100 \text{ \AA}$ iar protofibrilele au un diametru de $15 \text{ \AA}$.

Elementul de bază al fibrilei este molecula de colagen, de formă cilindrică, cu un capăt N-terminal și altul C-terminal, cu lungimea de $4,34 D$ și raza de $0,75 \text{ nm}$, când molecula este deshidratată, *in vitro* și $r = 1,0 \text{ nm}$ *in vivo* și se poate contracta cu aproximativ 25%.

Două molecule orientate N-terminal la C-terminal, de la stânga la dreapta, înbinate parte laterală pe parte laterală, capătul N-terminal al unei molecule este conectat la capătul C-terminal al alteia cu un spațiu suprapus, în parte, de $0,34 D$ și cu un gol de $0,66 D$ în lungime.

C-terminalul al unei molecule de colagen orientate nu poate să fie conectat la un C-terminal al altei molecule de colagen și nici N-terminalul la alt N-terminal, parte laterală la parte laterală sau cap la cap.

Microfibrilele sunt constituenții fibrilelor. S-a sugerat că microfibriliile sunt formați din $5k$ sau $5k+2$ molecule de colagen, iar $k=1,2$.

Analiza energetică a formării microfibrililor a dus la concluzia că valoarea lui k trebuie să fie 1.

Un microfibril se formează din cinci lanțuri de molecule de colagen, ceea ce confirmă actualitatea modelului sugerat de Smith (Fig.12.27) [48].

Toate fibrilele de colagen de același tip, de la aceeași specie, din același mediu biologic au configurații similare, sub formă de tijă, raportul lungime/diametru este constant, sunt bipolari ($N \leftrightarrow N$) sau monopolari ($N \rightarrow C$).

Fibrilul este o construcție spiralată de molecule de colagen și el crește strat cu strat. Rata de creștere a fibrililor este în funcție de numărul moleculelor libere de colagen.

Telopectidele au un rol însemnat în formarea fibrililor. C-telopectidele promovează creșterea laterală a agregării liniare precum și participarea la asamblarea liniară inițială. N-telopectidele duc la formarea fibrilelor pola-

rizate prin asamblarea 4 D. Obişnuit, fibrilele aderă la fibrele collagenice existente în structura ţesuturilor conjunctive. Are loc unirea prin părţile laterale ale fibrililor la părţile laterale a fibrelor de collagen sau unirea cap la cap (unidirecţională).

Doi fibrili monopolari cu molecule orientate N-terminal la C-terminal de la stânga la dreapta, unite parte laterală la parte laterală, duce la formarea de fibrili mai groşi şi unirea cap la cap duce la fibrili mai lungi (Fig.12.28)



Fig. 12.28 Unirea laterală a două fibrile monopolare, rezultând un fibril mai lung şi mai gros [4, 5].

A.Veis a propus o schemă în care fibrilele sunt constituite din microfibrile, care, la rândul lor, sunt compuse din unităţi fundamentale de patru molecule de collagen într-un aranjament decalat (Fig. 12.29.).

Unităţile tetramerice succesive sunt înşirate cu spaţii libere de 0,6 D (D periodicitatea fibrei native care este de 640Å) între molecule, aşa încât au regiuni de spaţii goale şi suprapuneri de molecule. Totuşi, moleculele individuale nu sunt tocmai egal spaţiate de-a lungul microfibrilelor, fiind separate prin trei intervale succesive de 1 D şi apoi de 2 D.

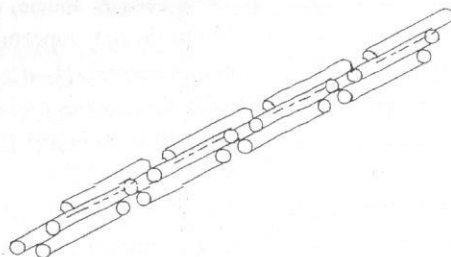


Fig.12.29. Ilustrarea împachetării unităţilor tetramerice pentru a forma microfibrile (A.Veis)

Stabilizarea structurii sugerate se bazează pe legături transversale de tipul γ_{222} între microfibrile şi de tipul γ_{111} intramicrofibrilar.

Cantitatea relativ mare de compuşi, probabil tetramoleculari, cu greutate moleculară de $1,2 \cdot 10^6$, găsită în soluţiile de collagen matur denaturat (A.Veis) şi aspectul filamentelor subţiri de collagen din fotografiile de la microscopul electronic (Veis, Steven) au venit în sprijinul modelului prezentat mai sus.

O structură fibrilară compusă în mod similar din filamente (microfibrile) ordonate, decalate arbitrar prin multipli întregi de D, a fost propusă de către Schmith (1986) (Fig.12.30.). În acest model, aranjamentul decalat cu o pătrime este păstrat în cadrul filamentelor, care sunt compuse din cinci lanţuri de molecule de collagen. Schmith a estimat diametrul de 30–40 Å, în funcţie de hidratare şi consideră că ar exista o legare transversală regulată, intrafilamentară, cap la coadă. Pentru nici unul din aceste modele fibrilare nu s-a stabilit vreo relaţie cu modelul ecuatorial rezultat la analiza cu raze X cu unghi mic, observat la tendonul din coada de şobolan.

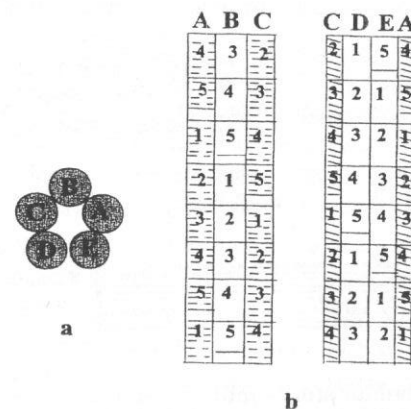


Fig. 12.30. Ilustrarea structurii de filament compus din cinci lanţuri moleculare de collagen într-un aranjament decalat regulat. Filamentul este prezentat în (a) privit în secţiune transversală şi în (b) privit perpendicular pe lungime, din două direcţii (Schmith).

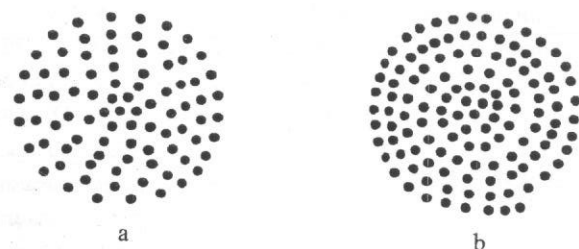


Fig. 12.31. Secțiune transversală a fibrilei de colagen propusă de Sasisekharan și Ramachandran; a. Secțiune cilindrică, b. secțiune cilindrică spiralată.

Un alt model de aranjare a structurii fibrilare a colagenului este structura cilindrică și cilindrică spiralată (Ramachandran și Sasisekharan) și structura hexagonală Burge). Aceste modele conțin, în secțiune transversală, aproximativ 150 molecule de colagen (Fig. 12.31).

În ciuda diferitelor concepții geometrice, relațiile intermoleculare sunt destul de asemănătoare în cele trei cazuri și ele duc la o concordanță aproximativ egală între distanțele calculate și cele observate (tabelul 12.15).

Tabelul 12.15.

Distanțele ecuatoriale măsurate cu raze X, intensitățile calculate și observate

Distanța observată	Distanțele în structurile (Å):			Intensitatea observată	Intensitatea în structurile	
	cilindrică	spiralată	hexagonală		cilindrică	hexagonală
—	110	99	100	—	44	241
—	66	65	63,5	—	12	62
49	49,5	49	46,2	3	4	26
37	38	39	36,3	3	3	13
31	31,5	32	29,9	m	2	8
—	26,5	27	—	—	2	—
24,5	23,5	23	25	m	1	3
20,5	20,5	20	21,8	W	2	4
18,8	18,5	—	19,3	m	1	3

17,0	16,8	17,3	17,1	m	3	5
13,5	13,9	14,0	14,1	Vs	38	11
12,6	12,6	12,6	12,6	Vs	93	93

Fibrilele sunt agregate în diverse moduri, adecvate necesităților structurale ale diferitelor părți anatomice. Astfel, fibrele dermului și ale tendoanelor sunt constituite din mănunchiuri de fibrile paralele.

Alte aranjamente sunt fâșiile suprapuse de fibrile paralele din corneea ochiului, aglomerări mai mult sau mai puțin întâmplătoare din rănile în curs de vindecare, diverse împâsliri complexe în diferitele părți ale corpului.

Fibra elementară de colagen este formată din 200 până la 1000 de fibrile, iar *fibra de colagen propriu-zisă* conține 30–300 fibre elementare de colagen.

Legături intramoleculare și intermoleculare. În colagen se formează, între lanțurile polipeptidice, dar și între grupările aceleiași lanț, legături intramoleculare și intermoleculare. Astfel, sunt legături de hidrogen, legături ionice, legături covalente, legături hidrofobe, legături prin intermediul moleculelor de apă (Fig. 12.32).

Legăturile intramoleculare dintre lanțurile polipeptidice reprezintă un factor de stabilizare a moleculei de colagen. Creșterea numărului acestor legături intra- și intermoleculare produce insolubilizarea treptată a colagenului, apariția dimerilor β și γ (Fig. 12.20.).

Cea mai mare parte dintre legăturile stabilite între lanțurile moleculei de colagen sunt legăturile de hidrogen, formate între un hidrogen a unei grupe aminice dintr-un lanț polipeptidic și oxigenul unei grupe carbonil dintr-un lanț polipeptidic vecin (Fig. 12.33.).

Glucidele formează legături glicozidice intramoleculare și intermoleculare (Fig. 12.33)

Pe măsura maturării colagenului, apar între lanțurile sale polipeptidice mai multe legături covalente, ca și legături ionice, legături hidrofobe și prin intermediul apei. Asamblarea moleculelor de colagen în vederea formării fibrililor și fibrelor este realizată prin multiple legături transversale.

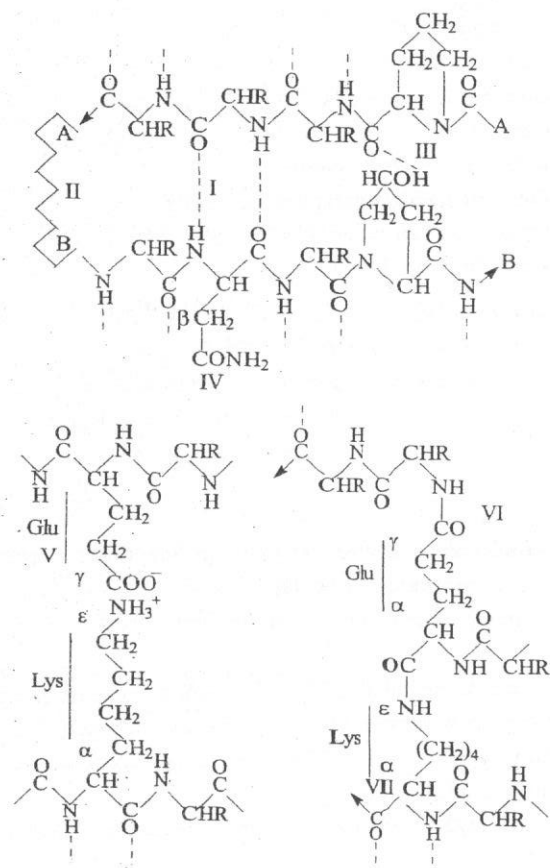


Fig.12.32. Diferite legături transversale la colagen. I. legături de hidrogen între lanțurile polipeptidice; II. legături de hidrogen intramoleculare; III. legături de hidrogen intramoleculare prin intermediul grupei OH a hidroxiprolinei; IV. formarea grupărilor amidice; V. legături saline între catenele laterale ale aminoacizilor dicarboxilici și bazici (exemplu, gruparea γ -carboxilică a acidului glutamic și gruparea ϵ -aminică a lizinei); VI. grupări amidice; VII. legături prin intermediul grupării ϵ -aminice a lizinei sau hidroxilizinei [12, 124].

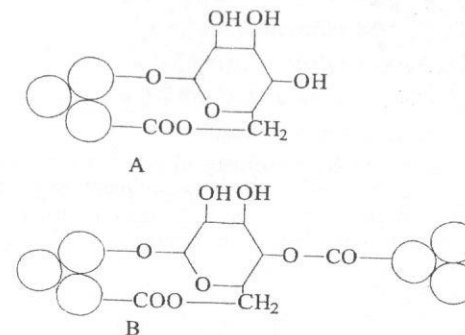


Fig.12.33. Participarea glucidelor la formarea legăturilor intramoleculare (A) și a legăturilor intermoleculare ale colagenului (B) [12, 125].

Principalele tipuri de legături intermoleculare care conectează moleculele de colagen sunt:

– *Legăturile de hidrogen* care acționează la distanțe de 2–3Å. Grupele hidro-xilice ale hidroxiprolinei, hidroxilizinei, serinei, tirozinei și treoninei, grupele aminice libere ale lizinei și argininei, grupele carboxilice libere ale acizilor dicarboxilici (acidul glutamic și acidul aspartic), monoamidele de la asparagină și glutamină sunt posibilitățile formării legăturilor de hidrogen între două lanțuri polipeptidice adiacente.

– *Legăturile ionice* acționează la distanțe de 10–100Å și apar ca forțe de coeziune electrostatice între grupele încărcate cu sarcini opuse, situate în regiunile polare a două lanțuri polipeptidice. Un tip particular al legăturilor ionice intermoleculare este reprezentat de unirea dintre grupa ϵ -aminică a lizinei cu grupa γ -carboxilică a acidului glutamic sau cu grupa β -carboxilică a acidului aspartic.

– *Legăturile covalente* contribuie la asigurarea stabilității colagenului. Când legăturile covalente apar în număr tot mai mare, colagenul devine din ce în ce mai matur. Legăturile intermoleculare se stabilesc atât între moleculele agregate în fibrile, cât și între fibrile și între fibrile și alți constituenți ai

tesutului conjunctiv, cum ar fi: proteine necolagenice (albumine, globuline), glicoproteine etc. Legarea glucidelor se realizează prin punți glicozidice de tip ester, între grupele hidroxil ale glucidului și grupele carboxil ale lanțurilor polipeptidice. O mare parte din hexoze sunt localizate în zona polară a moleculei de collagen și sunt fixate O-glicozidic la hidroxilizină. Au loc legături intermoleculare de tip aldolic și aldiminic ca și în cazul legăturilor intramoleculare.

– *Legăturile hidrofobe* se formează între catenele laterale ale aminoacizilor apolari (valina, leucina, izoleucina, fenilalanina). Aceste grupări au o afinitate redusă pentru apă și prezintă tendința de a se orienta în interiorul agregatelor moleculare.

– *Legăturile prin intermediul moleculelor de apă* participă la stabilizarea structurii cuaternare a collagenului [12], a moleculelor agregate în fibrile. Modul de asamblare a moleculelor de collagen în fibrile duce la realizarea unui anumit grad de liniaritate. Această liniaritate este favorizată de interpușterea moleculelor de apă între moleculele de collagen adiacente.

12.4. PROPRIETĂȚILE FIZICO-CHIMICE ALE COLAGENULUI

Principala caracteristică a edificiului chimic al collagenului este aceea a unei construcții complexe, ierarhizate, realizată în etape. Stabilitatea structurii pe etape și în ansamblul ei este obținută, în mare parte, prin numeroasele legături de hidrogen.

Acest aspect caracteristic scleroproteinelor face ca una dintre cele mai importante relații ale collagenului cu mediul exterior să fie reprezentată de relațiile sale cu apa [126, 127, 128]. Collagenul este solubil în soluții diluate de acizi, baze și săruri neutre. Sub acțiunea acizilor și bazelor collagenul se denaturează.

12.4.1. CARACTERUL COLOIDAL AL COLAGENULUI

Collagenul poate exista atât în stare de gel cât și în stare de sol. În stare solvită nu difuzează prin membrane semipermeabile, deoarece, particulele sale au mărimi mai mici de 1 μm , deci prezintă dimensiunile stării coloidale.

Caracterul coloidal al collagenului se datorește dimensiunilor macromoleculelor sale. Particula coloidală poate fi formată din macromolecule sau din agregate macromoleculare colagenice.

Starea coloidală a collagenului în soluție îi conferă toate proprietățile fizico-chimice caracteristice sistemelor coloidale și anume: presiune osmotică mică, putere de difuzie mică, prezența efectului Tyndhal, tensioactivitate etc.

Datorită caracterului coloidal pe care îl prezintă collagenul, prezența sa va influența repartitia unor ioni din soluțiile separate prin membrane semipermeabile, repartitie explicată de teoria echilibrului de membrană Donnan.

12.4.2. TEORIA ECHILIBRULUI DE MEMBRANĂ DONNAN

Studiind cazul repartitiei ionilor între două soluții separate printr-o membrană semipermeabilă, când de o parte a membranei se află ioni nedifuzibili, datorită caracterului lor coloidal, Donnan a putut constata că în momentul echilibrului apare între cele două soluții o inegalitate a ionilor difuzibili.

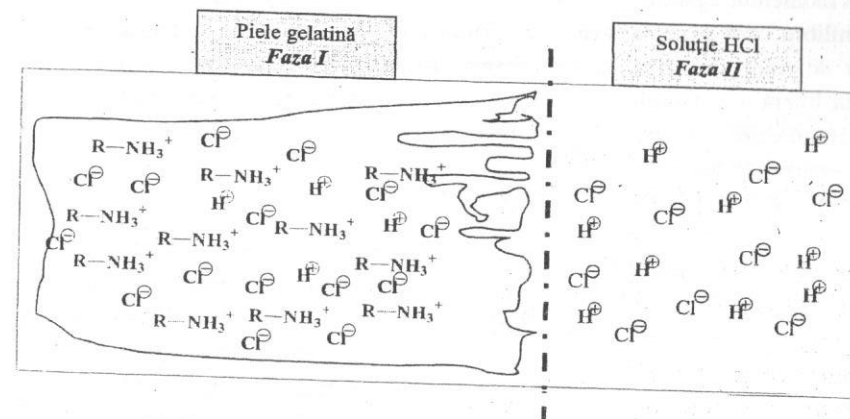


Fig.12.34. Exemplificare schematică a sistemului experimental

În cazul, de exemplu, a două soluții de acid clorhidric de concentrații diferite ($C_1 < C_2$), care sunt separate de o membrană semipermeabilă, după un

interval de timp, datorită difuziei, prin membrană, a ionilor din soluția mai concentrată în soluția mai diluată, concentrațiile celor două soluții se vor egala ($C_1 = C_2$) Fig.12.34

Travaliul procesului de transfer al ionilor din compartimentul soluției C_2 în compartimentul soluției C_1 , în condiții izoterme și când soluțiile sunt destul de diluate, poate fi exprimat din punct de vedere termodinamic prin relația:

$$A = nRT \ln \frac{C_2}{C_1} \quad (1)$$

în care,

n = numărul de moli – ioni transferați din compartimentul cu concentrația C_2 în cel cu concentrația C_1 ;

C_1 și C_2 = concentrațiile din cele două compartimente;

R = constanta gazelor;

T = temperatura absolută.

În momentul egalării concentrațiilor din cele două compartimente, starea de echilibru care se instalează este caracterizată prin aceea că modificările infinitezimale ale stării, la temperatură și volum constant, nu modifică energia liberă a sistemului, adică suma acțiunilor separate, corespunzătoare transferului celor doi ioni, trebuie să fie egală cu zero. În cazul când:

$$\text{pentru } H^+ : A = \Delta_n RT \ln \frac{(H^+)C_2}{(H^+)C_1} \quad (2)$$

$$\text{pentru } Cl^- : A = \Delta_n RT \ln \frac{(Cl^-)C_2}{(Cl^-)C_1} \quad (3)$$

vom avea:

$$\Delta_n RT \ln \frac{(H^+)C_2}{(H^+)C_1} + \Delta_n RT \ln \frac{(Cl^-)C_2}{(Cl^-)C_1} = 0 \quad (4)$$

în care : $[H^+]$ și $[Cl^-]$ sunt concentrațiile ionilor în moli, de unde rezultă că:

$$\ln \frac{(H^+)C_2}{(H^+)C_1} = - \ln \frac{(Cl^-)C_2}{(Cl^-)C_1} = \frac{(Cl^-)C_1}{(Cl^-)C_2} \quad (5)$$

$$\text{sau } (H^+)C_2 \cdot (Cl^-)C_1 = (H^+)C_1 \cdot (Cl^-)C_2 \quad (6)$$

$$\text{sau } \frac{(H^+)C_2}{(H^+)C_1} = \frac{(Cl^-)C_1}{(Cl^-)C_2} = \lambda \quad (7)$$

La echilibru, produsele concentrațiilor ionilor de semn contrar din cele două compartimente vor fi egale. Studiind cazul repartiției ionilor din momentul echilibrului, dacă ionii nu sunt deopotrivă de mobili, adică dacă nu toți ionii sunt difuzibili prin membrana semipermeabilă, din cauza caracterului lor coloidal, Donnan a constatat o inegalitate în repartiția ionilor difuzibili în momentul echilibrului. În cazul proteinelor, pentru a se demonstra această inegalitate de repartiție, se folosește sistemul collagen-soluție de acid clorhidric.

Colagenul îndeplinește rolul ionului indifuzibil prin membrana semipermeabilă, care în cazul mediului acid este încărcat pozitiv iar ionii acidului clorhidric sunt difuzibili. În sistemul considerat, colagenul joacă și rol de membrană semipermeabilă. S-a luat o probă de piele gelatină, la care fața pielii s-a considerat a fi membrană semipermeabilă, restul pielii gelatină fiind faza I, iar soluția de acid clorhidric faza II.

În momentul introducerii unei bucăți de piele gelatină în soluția de acid clorhidric, începe difuzia ionilor H^+ și Cl^- din soluție în piele, ionul proteic cationic neputându-se deplasa, fiind fixat de structură.

La echilibru, repartiția ionilor din sistem va fi cea prezentată în schema:

Piele gelatină (faza I)	Soluție de acid clorhidric (faza II)
$R-NH_3^+ = z$	$H^+ = x$
$Cl^- = z$	$Cl^- = x$
$H^+ = y$	
$Cl^- = y$	

Unde:

– z reprezintă concentrația de ioni indifuzibili (ioni fixați); ionii de Cl^- notați cu z din faza I sunt cei combinați cu grupele aminice ale colagenului prin legături de electrovalență;

– y reprezintă ionii H^+ și Cl^- trecuți din faza II în faza I și sunt în stare liberă (ioni mobili);

– x reprezintă concentrația ionilor H^+ și Cl^- din soluția exterioară (faza II), ioni mobili.

În acest caz: $y + z$ este concentrația totală a ionilor capabili de a difuza, prezenți în colagen și de semn contrar indifuzibili.

Aplicând ecuația (6) sistemului de mai sus, avem:

$$x^2 = y(y + z) \quad (8)$$

Această ecuație a echilibrului de membrană fundamentează teoria lui Donnan.

În situația ionilor polivalenți, de exemplu, în cazul echilibrului colagenului cu o soluție de acid sulfuric, pe baza repartiției ionilor la echilibru, ecuația (8) devine:

$$x^3 = y^2 (y + z)$$

Când ionii nedifuzibili, în urma unor tratamente determinate dispar, $z = 0$, iar $x = y$, în toate celelalte cazuri $x > y$. Aceasta înseamnă că la echilibru, în pielea gelatină concentrația ionilor de H^+ în mediu acid sau a ionilor OH^- în mediu alcalin, va fi întotdeauna mai mică decât în soluția exterioară.

În urma repartiției inegale a ionilor capabili de a difuza, se naște între pielea gelatină și soluția înconjurătoare, o diferență de potențial E , care poate fi exprimată prin relația lui Nernst:

$$E = \frac{RT}{F} \ln \lambda \quad (9)$$

în care:

R = constanta gazelor;

T = temperatura absolută;

F = numărul lui Faraday (96500);

λ = raportul concentrațiilor conform ecuației (7).

În raport cu soluția exterioară, colagenul este încărcat ca și ionul fixat; aceasta înseamnă că în toate cazurile în care $x > y$ vom avea în mediul acid $\lambda_a > 1$, iar în mediu alcalin $\lambda_b < 1$.

Dacă în expresia potențialului E se înlocuiește pe RT/F cu valoarea sa corespunzătoare la temperatura de 18°C și se trece de la logaritmi naturali la cei zecimali se obține relația:

$$E = 58 \log \lambda \text{ milivolți} \quad (10)$$

Expresia potențialului de membrană se simplifică și mai mult, dacă se ex exprimă λ prin diferența dintre valoarea pH-ului soluției și a colagenului, adică plecând de la:

$$E = 58 \log \frac{(\text{H}^+)_{\text{ext}}}{(\text{H}^+)_{\text{int}}} = (\text{H}^+)_{\text{ext}} - 58 \log (\text{H}^+)_{\text{int}} \quad (11)$$

Știind că pH-ul este logaritmul cu semn schimbat al concentrației ionilor de hidrogen, se obține:

$$E = 58 (\text{pH}_{\text{int}} - \text{pH}_{\text{ext}}) \text{ milivolți} \quad (12)$$

Toate deducțiile anterioare au fost făcute pornindu-se de la premiza suprimării totale, în mediu acid, a disocierii grupelor carboxilice, iar în mediu alcalin a grupelor aminice. În realitate, aceasta se întâmplă numai în mediu foarte acid sau foarte alcalin.

În cazul electroliților monobazici, numărul total de ioni capabili de a difuza, aflați într-un litru de soluție care înconjoară proba de piele gelatină este $2x$, iar al celor dintr-un litru de piele gelatină de $2y + z$.

Folosind ecuația fundamentală a echilibrului de membrană Donnan (8), se poate dovedi că $2y + z$ este întotdeauna $> 2x$.

Aceasta este o consecință matematică, care rezultă din ecuația fundamentală, în care produsul a două egalități este egal cu produsul a două inegalități. În cazul unei astfel de relații, suma egalităților este întotdeauna mai mică decât suma inegalităților, adică:

$$2y + z > 2x \quad (13)$$

De aici rezultă că în pielea gelatină umflată va fi un exces de ioni difuzibili în soluția înconjurătoare, exces de ioni care este egal cu :

$$e = 2y + z - 2x \quad (14)$$

Această ecuație este, de asemenea, fundamentală pentru teoria echilibrului de membrană Donnan.

Excesul de ioni în cazul acizilor bibazici este dat de formula :

$$e = \frac{1}{2} (3y + z - 3x) \quad (15)$$

Dacă se înlocuiește y din ecuația (14) cu valoarea sa din ecuația (8) se obține relația :

$$e = \sqrt{4x^2 - z^2} - 2x \quad (16)$$

Din ecuația (16) rezultă dependența excesului de ioni (e) din collagen de concentrația ionilor din soluția exterioră (x) și de concentrația ionilor fixați de proteină prin intermediul grupelor acide sau bazice.

După ce se combină prin legături ionice toate grupele bazice (la adăugarea de acid) sau toate grupele carboxilice (la adăugarea de alcalii), valoarea z nu mai poate crește.

Din acest moment, creșterea concentrației ionilor x prin adăugarea de electrolit în sistem, nu determină creșterea numărului de ioni fixați, deci valoarea z rămâne constantă.

Dacă z rămâne constant ca valoare, adăugarea de electrolit, în continuare, duce la scăderea excesului de ioni (e), așa cum se poate constata din relația (16).

Calculul excesului de ioni (e) pentru cazul când $z = 2$, la diferite valori ale lui x este dat mai jos:

x	e
1	0,8
2	0,5

3	0,3
5	0,2
10	0,04
100	0,002

Consecința acestui fapt este dispariția, la un moment dat, a inegalității de repartitie a ionilor în momentul echilibrului.

Creșterea concentrației ionilor în soluția exterioră (creșterea valorii lui x) poate fi realizată fie prin folosirea unui exces de acid sau bază, fie prin adăugarea, în soluția exterioră a sărurilor neutre a căror prezență nu determină ionizarea suplimentară a proteinei.

Dacă se compară sistemul collagen-acid clorhidric cu sistemul collagen-acid clorhidric-clorură de sodiu, la concentrații egale de acid, se constată că adăugarea de electrolit neutru mărește concentrația ionilor difuzibili fără a crea exces de ioni de H^+ în collagen:

Collagen + HCl		Collagen + HCl + NaCl	
Collagen	Soluția exterioră	Collagen	Soluția exterioră
$R-NH_3^+ = z$	$H^+ = x$	$R-NH_3^+ = z$	$H^+ = x$
$Cl^- = z$	$Cl^- = x$	$Cl^- = z$	$Na^+ = x$
$H^+ = y$		$H^+ = y$	$Cl^- = x$
$Cl^- = y$		$Cl^- = y$	

Adăugarea de săruri neutre în sistemul collagen-acid sau collagen-bază duce la scăderea potențialului de membrană. Această scădere se accentuează odată cu creșterea cantității de săruri neutre.

12.4.3. ADSORBȚIA VAPORILOR DE APĂ DE CĂTRE COLAGEN

Relația dintre apă și piele este unul dintre cele mai importante fenomene ale vieții. O funcție importantă a pielii este de a regla temperatura organismului, și la aceasta contribuie esențial asocierea apei cu pielea.

Evaporarea unui gram de apă provoacă o pierdere de căldură de 0,54 Kal

și înlesnește omului să suporte temperaturi mai mari de 60°C , dacă aerul înconjurător are o umiditate destul de coborâtă încât să permită evaporarea transpirației.

S-a arătat în capitolul 3 (Vol.II) că gheața (apa solidă) are un aranjament molecular de bază într-o rețea hexagonală, fiecare moleculă de apă are legături de hidrogen cu vecinele sale, formând un fel de polimer. Apa lichidă formează, de asemenea, legături de hidrogen cu moleculele învecinate, fără a se ajunge la o structură atât de stabilă ca în apa solidă.

Cu creșterea temperaturii, se rup legăturile de hidrogen, astfel că, la temperatura de fierbere apa se află sub formă de „monomer” [92].

Cea mai importantă legătură a apei cu colagenul este legătura de hidrogen. Frank și Wen [113,131] consideră că o legătură de hidrogen se formează numai dacă electronii sunt polarizați. Polarizarea unei perechi de electroni atrage după sine polarizarea electronilor moleculei și, prin urmare, a tuturor celor de pe moleculele învecinate, creându-se un efect de rezonanță de cooperare pe un grup mai mare care formează un „ciorchine”.

Colagenul absoarbe din atmosfera înconjurătoare o cantitate de vapori de apă în funcție de umiditatea relativă a aerului și de temperatură, care poate ajunge până la jumătate din greutatea sa.

S-au efectuat cercetări asupra reacției vaporilor de apă cu colagenul de către H.B.Bull, J.R.Kanagy și P. Bhaskara [113]. Izotermele care indică adsorbția apei la 28° , 50° și 70°C sunt date în figura 12.35.

O astfel de curbă de adsorbție poate fi împărțită în trei segmente.

Primul segment, pentru tensiuni mici de vapori, este tipic unei adsorbții Langmuir. Cantitatea adsorbită crește rapid cu creșterea presiunii vaporilor.

Urmează cel de al doilea segment, care este liniar și are o înclinare lină. El se extinde până la umiditatea relativă de circa 65%.

În cel de al treilea segment, panta curbei crește indicând o adsorbție puternică. În această zonă, poate avea loc condensarea capilară. Apa adsorbită produce depărtarea elementelor microstructurale ale colagenului între ele.

Pauling [4] atribuie adsorbția apei grupelor polare specifice ale colagenului și a proteinelor, în general. În proteine există două tipuri principale de

grupe hidrofile: grupele lanțurilor laterale polare ale aminoacizilor, ca acidul glutamic, acidul aspartic, arginina, tirozina, lizina etc., și grupele carbonil și amido ale legăturilor peptidice.

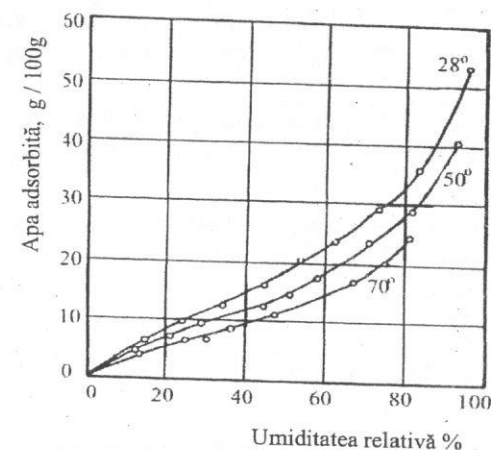


Fig.12.35. Absorbția vaporilor de apă de către colagen la diferite umidități relative și la 28° , 50° și 70°C .

Acestea din urmă sunt mult mai abundente.

Totuși, datele lui Bull privitoare la nylon arată că legăturile peptidice nu exercită o atracție deosebită față de apă.

Cercetările întreprinse de Mellon, Korn și Hoover [113] pe poliglicine, care nu au grupe polare laterale, ci numai grupe carboxilice și aminice terminale, au arătat că apa a fost adsorbită și de grupele peptidice.

Se pare că grupele peptidice ar fi responsabile pentru aproximativ 45% din apa adsorbită în faza de vapori de către cazeină și de 70% de către zeină la umiditatea relativă de 60%.

Cazeina benzoilată adsoarbe cu 24–33% mai puțină apă, în funcție de umiditatea relativă a aerului, ceea ce arată rolul grupelor aminice [113].

Frey și Moore au studiat adsorbția vaporilor de apă de către pulberi cristaline de glicină, leucină, dicetopiperazină și diglicilglicină la 15° , 25° și 40°C

și a reieșit că adsorbția are loc, în primul rând, la grupele COO^- și NH_3^+ ale aminoacizilor și la legăturile peptidice la dicetopiperazină.

Raporturile energetice între apă și colagen pot fi determinate prin calorimetrie sau prin măsurarea adsorbției la două temperaturi diferite prin ecuația Clausius–Clapeyron [129].

Măsurătorile directe ale căldurii de umezire sau a căldurii de adsorbție asupra colagenului, a pielii tăbăcite, mătăsii, lânii au fost făcute de Kanagy și rezultatele sunt trecute în tabelul 12.16. [113].

Aceste date reprezintă căldura totală degajată la submersia în apă, la temperatura de 25°C , a materialului uscat pentru colagen nativ, pudră de piele dezaminată, piele tăbăcită, lână și mătase.

Din datele tabelului 12.16., se observă că la colagen, căldura de umezire este mai mare decât al oricărui material prezentat.

Tabelul 12.16.

Materialul	Căldura degajată, cal/g
Colagen	37,1
Pudră de piele (tăbăcită cu aldehydă formică)	33,9
Pudră de piele desaminată	30,9
Piele tăbăcită în crom	31,5
Piele tăbăcită vegetal	21,7
Lână	20,8
Mătasea naturală	13,7

Aceasta se datorește dimi-nuării grupelor reactive capabile de a se combina prin legături de hidrogen cu apa, în cazul celorlalte materiale decât colagenul. Există o corelație între căldura totală degajată și cantitatea de apă adsorbită. Căldura degajată este direct proporțională cu cantitatea de apă care se combină cu materialul (Fig.12.36.).

Pe măsură ce cantitatea de apă pe care o conține un material este mai mare, cantitatea de căldură ce poate fi cedată este mai mică. Colagenul este

capabil să cedeze cea mai mare cantitate de căldură în comparație cu materialele experimentate (tabelul 12.16.).

Adsorbția primelor cantități de vapori de apă se face cu cedare mare de căldură în cazul tuturor materialelor prezentate.

În cazul colagenului complet uscat, la adsorbția unui mol de apă se eliberează 4530 cal. Căldura de hidratare scade cu creșterea cantității de vapori de apă adsorbită. Dacă colagenul are un conținut de 8% apă, atunci căldura de hidratare ajunge la 2380 cal, la 16% apă la 1440 cal, iar la 32% apă scade la numai 670 cal.

12.4.4. MECANISMUL ADSORBȚIEI APEI DE CĂTRE PIELE

Comparativ cu alte organe, pielea nu este deosebit de bogată în apă, în condiții fiziologice normale. Dintre țesuturile moi, pielea conține cea mai puțină apă pe unitatea de greutate.

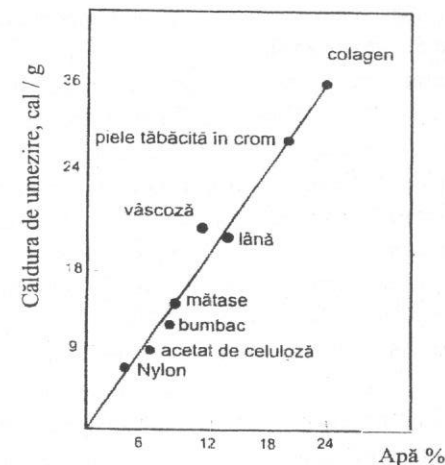


Fig.12.36. Corelația între căldură și umiditate, în procente de vapori de apă adsorbiți la 65% umiditate relativă [113].

La om, pielea reprezintă 16–18% din greutatea totală a corpului și conține

18–20% din totalul de apă din organism, în timp ce mușchii reprezintă 41–42% din greutatea corpului și conțin cam jumătate din totalul de apă a organismului.

Aproximativ 75% din totalul de apă extracelulară a corpului se găsește în mușchi și în piele. În pofida conținutului său mai redus de apă comparativ cu alte țesuturi moi ale corpului, în piele se acumulează o cantitate de apă care poate să varieze în timp, după necesități, fără să cauzeze vreo dereglare funcțională [92].

Conținutul în apă variază în funcție de proveniența pielii, vârsta, sexul, regiunea topografică și condițiile de viață ale animalului.

Pielea, considerată ca un material biologic ideal de adsorbție a apei, poate fi privită ca un sistem heterogen constând dintr-o rețea de țesut conjunctiv, predominant colagenic, componente de schimb metabolic, mucopolizaharide și, mai ales, acid hialuronic, a cărei modificări afectează permeabilitatea pielii. Atât proteinele din piele, cât și mucopolizaharidele, joacă un rol important în controlarea conținutului în apă a pielii. Țesutul conjunctiv al pielii poate să asimileze cantități mari de apă care, de multe ori, au fost raportate ca aparținând unuia din cele două tipuri de apă: „apă liberă” și „apă legată”.

Apa legată este considerată, cel mai frecvent, ca acea parte din total care nu este disponibilă pentru dizolvarea neelectroliților solubili în apă. Se apreciază că circa 80% din apa din piele este „apă liberă” și 20% „apă legată”.

Studiile privind îndepărtarea apei din pielea de oaie prin uscare, au arătat că energia de activare aparentă necesară rămâne aproximativ constantă pe un interval de valori al conținutului de apă în piele de aproximativ 600% până la 10% (exprimat în umiditate absolută), când mecanismul de legare a apei de către piele este același. Sub un conținut de apă de 10% are loc o fixare a sa mai puternică, deoarece energia de activare aparentă pentru îndepărtarea acestor ape a crescut puternic.

Grupele polare ale colagenului ($-\text{OH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$) și legăturile peptidice sunt responsabile pentru fixarea rezistentă a apei.

R.L. D'Arcy și I.C. Watt [132] au arătat că la grupele polare ale colagenului are loc adsorbția unui strat monomolecular de apă care este pu-

ternic legat și de care sunt fixate alte straturi cu intensități descrescând.

În fază lichidă, majoritatea moleculelor de apă sunt asociate cu alte molecule de apă și nu direct cu colagenul. Limitele dintre straturile de molecule de apă de la grupele polare ale colagenului, care nu au proprietățile apei lichide și moleculele de apă lichidă asociate între ele este mai greu de delimitat.

A.G. Ward sugerează că un strat de apă cu grosimea de trei molecule este maximum pentru care forțele de adsorbție sunt suficiente pentru a cauza o modificare a structurii normale a apei, iar G.N. Ling presupune că opt straturi de molecule de apă suprapuse între două suprafețe polare sunt în stare polarizată [133].

Apa este o componentă integrală a structurii colagenului și există numeroase dovezi care arată că pentru menținerea structurii sale fibrilare prezența unei anumite cantități de apă este esențială.

În figura 12.37. este dată o reprezentare a umflării fibrilelor în diferite condiții, din care se pot aprecia și modificările dimensionale ale lor.

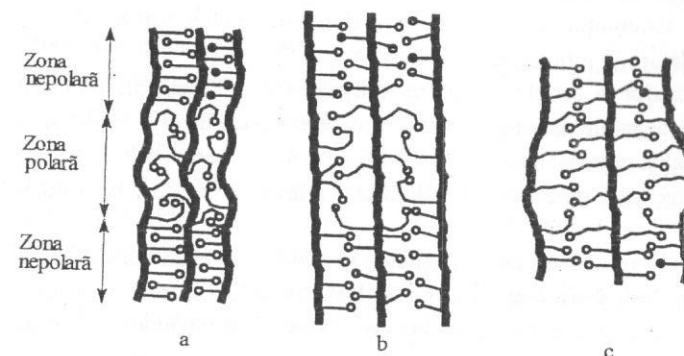


Fig. 12.37. Reprezentarea diagramică a diferențelor dintre un fibril uscat (a), un fibril umflat în apă la pH neutru (b) și un fibril umflat acid (c).

Gradientul de conductivitate al colagenului este influențat de gradul de hidratare al său și de temperatura mediului (134). În mediul ambiant conductivitatea se schimbă de la $10^{-15}(\Omega \text{ cm})^{-1}$ în stare uscată, la aproximativ $10^{-8}(\Omega \text{ cm})^{-1}$ când colagenul are 24 % umiditate.

Entalpia colagenului crește brusc când umiditatea se mărește de la 0 la 28%, atingând un maximum de 14,3 cal/g [135]. Efectul adsorbției de apă asupra entalpiei se explică prin formarea punților de apă în interiorul triplului helix al colagenului. La un conținut de apă de 30–60%, entalpia descrește cu 2 cal/g datorită probabil interacțiunii dintre structurile secundare ale apei și apa din interiorul triplului helix.

12.4.5. INTERACȚIUNEA COLAGENULUI CU ACIZII ȘI BAZELE

Colagenul este un produs amfoter datorită grupelor acide și bazice ale catenelor laterale ale lanțurilor polipeptidice. Un rol deosebit îl au grupele aminice și carboxilice. Grupele amidice ale lanțurilor polipeptidice și grupele hidroxilice ale catenelor laterale au o însemnătate redusă asupra caracterului amfoter. Prin introducerea colagenului în mediu acid sau alcalin se constată o tendință puternică de pătrundere a apei. Are loc umflarea care este determinată de pH-ul sistemului și de capacitatea de combinare a colagenului cu acizii sau bazele.

Legarea acizilor și bazelor de către collagen este în funcție de numărul grupelor polare capabile de a se salifia și este determinată de rapoartele stoechiometrice dintre proteină și acizi sau baze. Aceste rapoarte sunt constante când acțiunea acizilor și bazelor se limitează numai la legături intermoleculare.

Echilibrul electrochimic sau capacitatea maximă a colagenului de a lega acizii sau bazele este cantitatea de proteină deshidratată, în grame, necesară a se combina cu un echivalent gram de acid sau bază și care depinde de natura acestora [92]. Se poate determina pe cale titrimetrică sau potențiometrică.

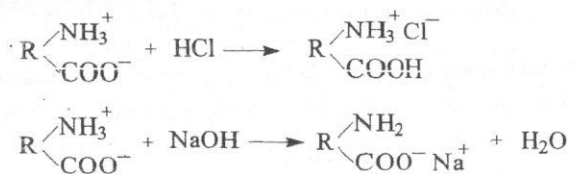


Fig.12.38. Combinarea colagenului cu acizi și baze

Capacitatea de combinare a colagenului cu acizii este mai mare decât capacitatea de combinare cu bazele: 0,99 miliechivalenți / 1g proteină, respectiv, 0,88 miliechivalenți/g proteină.

12.4.5.1. pH-ul IZOELECTRIC AL COLAGENULUI

Compensarea internă a sarcinilor pozitive și negative ale colagenului corespunde unui anumit pH denumit pH izoelectric (pH_i).

La pH-ul izoelectric (pH_i) al unei soluții sau suspensii de collagen nu are loc nici o migrare într-un câmp electric. La pH_i , collagenul are un minim de umflare, de solubilitate, de presiune osmotică, de vâscozitate, de ionizare și de asemenea, proprietățile sale de combinare acidă sau alcalină sunt minime. Gelurile de collagen la pH_i au o putere maximă de difuzie a luminii (efectul Tyndall) și un maxim de rezistență la forfecare.

Valoarea pH_i a colagenului se modifică doar dacă se schimbă raportul cantitativ dintre grupele sale acide sau bazice capabile de a ioniza.

În soluție, vor ioniza grupele acide sau bazice ale colagenului în funcție de pH-ul mediului și de poziția acestuia față de pH_i . Când $\text{pH} < \text{pH}_i$ collagenul va funcționa ca bază și la $\text{pH} > \text{pH}_i$ se va comporta ca un acid.

Pentru determinarea pH-ului izoelectric al colagenului se folosesc metode directe: titrarea potențiometrică, cataforeza în soluții tampon, electroforeza și metode indirecte ca: măsurarea gradului de umflare, determinarea combinării cu coloranții bazici sau acizi, măsurarea vâscozității etc.

Folosind măsurarea gradului minim de umflare a colagenului sau vâscozitatea minimă (în cazul soluțiilor de collagen sau a pastelor) drept criterii de determinare al pH_i se obțin valori aproximative.

pH-ul izoelectric al colagenului, ca de fapt, pentru orice proteină, este oarecum variabil, depinzând de compoziția ionică a mediului, deoarece proteinele pot lega anumiți anioni sau cationi.

Diferiți cercetători au stabilit că pH_i are valori de 7,0 până la 7,8.

Când o soluție de collagen se dializează intens contra apei distilate, pentru a se îndepărta toți ionii mici, în afară de H^+ și OH^- , pH-ul soluției care rămâne este cunoscut sub numele de *pH-izoionic*.

PH-ul izoionic este o constantă a fiecărui tip de proteină.

Colagenul tratat alcalin își modifică pH_i până la valori de 5,0–5,5. Aceasta se datorește procesului de dezaminare și de formare de noi grupe carboxilice libere. De exemplu, la tratarea pieilor la operația de cenușărire, cu o suspensie de hidroxid de calciu și sulfură de sodiu, o parte importantă din grupele amidice din lanțurile laterale ale aminoacizilor asparagina și glutamina sunt scindate, prin hidroliză, la grupe carboxilice și amoniac liber.

Colagenul cenușărit conține aproximativ 1,0 miliechivalenți/g collagen grupe carboxilice libere și 0,85 miliechivalenți/g collagen grupe cationice.

Este posibil ca devierea pH-ului izoelectric al collagenului nativ spre partea acidă, la tratarea cu alcalii, să se datoreze și distrugerii parțiale a grupelor guanidinice libere de la arginină. Se știe că arginina se descompune, în prezența alcaliilor, în ornitină și uree (Fig.12.38.).

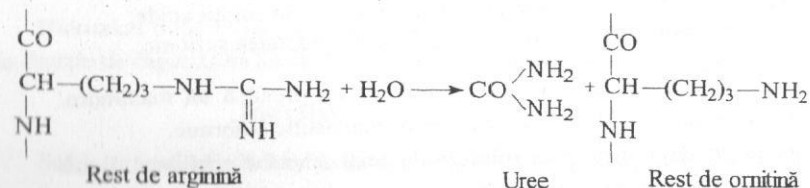


Fig.12.38. Degradarea argininei din collagen în ornitină și uree în mediu alcalin.

A.G.Ward sugerează că un strat de apă cu grosimea de trei molecule este maximum pentru care forțele de adsorbție sunt suficiente pentru a cauza o modificare a structurii normale a apei, iar G.N. Ling presupune că opt straturi de molecule de apă suprapuse între două suprafețe polare sunt în stare polarizată [133].

Apa este o componentă integrală a structurii collagenului și există numeroase dovezi care arată că pentru menținerea structurii sale fibrilare prezența unei anumite cantități de apă este esențială.

În cazul unui tratament îndelungat a collagenului cu o suspensie de var, poate să aibă loc hidroliza legăturilor peptidice.

Deoarece într-un lanț polipeptidic din molecula de collagen cam a patra legătură dintre resturile de aminoacizi este gruparea $-\text{CO}-\text{N}=\text{}$, ce se formează între prolină sau hidroxiprolină, la hidroliza acestei legături va rezulta o grupă carboxilică puternică și o grupă bazică slabă $=\text{NH}$, spre deosebire de hidroliza legăturii $-\text{CO}-\text{NH}-$ care se transformă într-o grupă aminică și una carboxilică puternice. Prin hidroliza grupei cetoimidice ($-\text{CO}-\text{N}=\text{}$) este de așteptat să crească sarcina negativă a collagenului și, în consecință, să devieze pH_i spre valori mai scăzute ale pH-ului.

La tratarea intensă a collagenului cu soluții alcaline, acizii aminici hidroxilafatici (serina și treonina) suferă modificări neînsemnate, iar aminoacizii dicarboxilici (acidul glutamic și acidul asparagic) sunt eliminați din collagen.

12.4.5.2. INTERACȚIUNEA COLAGENULUI CU ACIZII

La tratarea collagenului cu soluții cu concentrații mici de acid are loc o legare stoechiometrică a cationilor de grupele sale carboxilice, iar anionii acidului se combină cu grupele bazice.

Se produce mărirea stabilității hidrotermice a collagenului, probabil datorită apropierei reciproce a catenelor polipeptidice.

Cu creșterea concentrației soluțiilor de acid stabilitatea hidrotermică scade brusc, la un moment dat, ca urmare a ruperii legăturilor de hidrogen, ceea ce are drept consecință modificarea ireversibilă a stabilității triplului helix a moleculelor de collagen.

Combinarea maximă prin legături ionice are loc la $pH=1,0-1,5$ [90].

Dacă se ia, de exemplu, sistemul collagen-soluție de acid clorhidric, echilibrul poate fi determinat cu ajutorul legii acțiunii maselor :



unde $\text{R}-\text{NH}_3^+$ este ionul cationic de collagen și Cl^- anionul acidului clorhidric:

$$K = \frac{[\text{R}-\text{NH}_3^+][\text{Cl}^-]}{[\text{R}-\text{NH}_3\text{Cl}]}$$

Valoarea constantei de echilibru K depinde de afinitatea anionului față de colagen. Creșterea concentrației în Cl^- din colagen determină mărirea numărului de grupe bazice lipsite de sarcini. În general, ecuația constantei de echilibru K arată că în cazul acumulării de anioni în țesutul colagenic are loc mărirea cantității de grupe bazice lipsite de sarcini.

Creșterea concentrației ionilor excedentari din țesutul colagenic (y) poate fi calculată din ecuația echilibrului de membrană Donnan, care începe să crească după ce s-a ajuns la valoarea de pH la care umflarea este maximă.

În același timp, concentrația ionilor fixați (z) scade datorită creșterii treptate a numărului de grupe bazice nedisociate. În partea stângă a maximumului de pe curba umflării acide (Fig. 12.39.) se observă cum curba coboară, deci, umflarea începe să scadă.

Comparând curbele de umflare ale colagenului cu diverși acizi se constată că acidul clorhidric produce cea mai puternică umflare. Umflarea colagenului în acid β -naftalen sulfonic este mai mică decât în acid sulfuric sau acid clorhidric, deși este un acid puternic, iar constanta de ionizare se apropie de constanta de ionizare a acidului clorhidric.

Diferența dintre gradul de umflare a colagenului în acid β -naftalen sulfonic și acid sulfuric este explicată prin faptul că afinitatea acizilor sulfonici aromatici este mai mare și are ca rezultat scăderea ionizării compusului colagen - acid β -naftalen sulfonic, deoarece se micșorează factorii osmotici și electrostatici.

Compușii acizilor sulfonici aromatici cu structură mai complexă nu produc umflarea colagenului și nu se îndepărtează prin spălare cu apă. De asemenea, pot dezlocui acizii simpli legați de colagen. Așa este cazul tananților sintetici și ai coloranților sintetici.

Deci, reducerea umflării colagenului poate fi realizată nu numai prin micșorarea unui exces de acid, ci și prin folosirea unor acizi cu o afinitate mai mare față de proteine.

Compușii organici neionizabili ca formamida, metacrezolul produc umflarea colagenului. În mod analog acționează și acidul acetic a cărei ionizare este apropiată de cea a grupelor carboxilice din colagen.

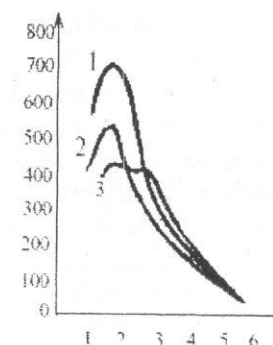


Fig. 12.39. Curbele de umflare ale colagenului în soluții acide:
1. acid clorhidric; 2. acid sulfuric; 3. acid β -naftalen sulfonic.

În soluții concentrate de acid acetic umflarea nu prezintă un maximum. Același lucru este valabil și în cazul soluțiilor de acid lactic și formic.

Adăugarea de săruri neutre în soluțiile de acizi schimbă echilibrul dintre acid și colagen. Conform teoriei echilibrului de membrană Donnan, adăugarea de sare scade inegalitatea de repartiție a ionilor între colagen și soluție, iar pH-ul colagenului scade (tabelul 12.17.).

Tabelul 11.17.

Influența NaCl asupra valorii pH-ului soluțiilor de HCl și H_2SO_4

Acidul	Concentrația acidului (N)	pH-ul la concentrațiile în NaCl de :			
		0	0,1 N	1,0 N	4,0 N
HCl	0,01	2,11	2,06	1,91	1,24
HCl	0,10	1,08	1,06	0,91	0,20
H_2SO_4	0,01	2,11	2,06	1,91	1,24
H_2SO_4	0,10	1,19	1,18	0,98	0,30

Acidul azotos produce dezaminarea colagenului acționând asupra aminoacizilor: lizina, arginina, tirozina, serina și treonina.

Grupa ϵ -aminică a lizinei și grupa guanidinică a argininei sunt puternic ata-cate. Acidul asparagic, acidul glutamic, glicina, prolina, hidroxiprolina, leucina, izoleucina, valina, alanina, fenilalanina, histidina și metionina nu sunt atacate de acidul azotos.

12.4.5.3. INTERACȚIUNEA COLAGENULUI CU ALCALIILE

Umflarea colagenului în mediu alcalin se explică în același mod, ca și umflarea acidă. În funcție de intensitatea umflării ce o produc, hidroxizii monobazici se ordonează în următoarea succesiune:



Hidroxizii bibazici au o putere de umflare mai mică decât cei monobazici. În funcție de capacitatea lor de umflare, hidroxizii bibazici se ordonează astfel:



Scăderea umflării, în funcție de natura hidroxidului, se explică prin reducerea factorului osmotic determinat de constanta de ionizare mai mică, în comparație cu cea a hidroxizilor monobazici.

Ca și în mediu acid, în mediu alcalin, odată cu creșterea alcalinității, la o anumită valoare, umflarea scade. Dacă umflarea acidă scade mult prin adăugare de sare neutră, umflarea alcalină scade efectiv puțin, iar în unele cazuri nu poate fi redusă. Face excepție de la regulă umflarea la tratarea colagenului cu hidroxid de sodiu. Curba umflării cu hidroxid de sodiu crește vertiginos începând cu $\text{pH}=9$ până la $\text{pH}\approx 11$, după care continuă cu o pantă lină până la $\text{pH}\approx 12,5-13,0$ și apoi umflarea crește după o curbă aproape verticală (Fig.12.40.).

La pH puternic alcalin, hidroxidul de sodiu produce o hidroliză accentuată asupra colagenului, prin ruperea legăturilor de hidrogen și a unor legături covalente, care face ca structura fibroasă a colagenului să devină mai laxă, ceea ce favorizează continuarea hidratării suplimentare.

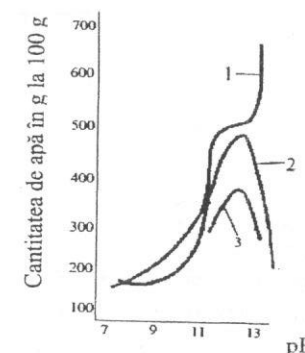


Fig.12.40. Curbele de umflare ale colagenului în mediu alcalin.
1. NaOH; 2. NH_4OH ; 3. $\text{Ca}(\text{OH})_2$

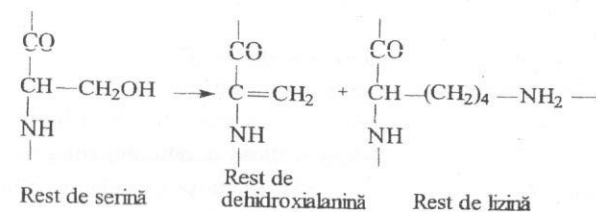
12.4.5.4. MODIFICĂRILE PRODUSE DE ACIZI ȘI ALCALII ASUPRA COLAGENULUI

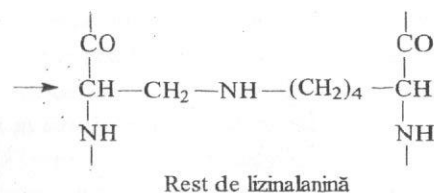
Sub influența acizilor și bazelor au loc o serie de modificări chimice ale colagenului, care se manifestă asupra aminoacizilor, macromoleculelor de collagen și a structurii fibroase, producând afânarea microstructurii și chiar pierderi de substanță colagenică.

Modificările produse de acizi și alcalii sunt influențate de natura acizilor sau a alcaliilor, de concentrație, durata de tratament și temperatură.

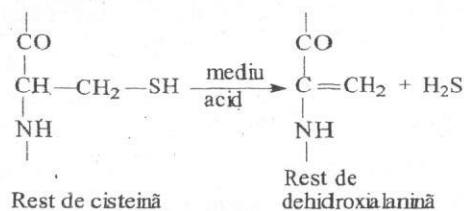
Modificări produse aminoacizilor. La tratarea alcalină a colagenului și mai ales cu hidroxid de sodiu, se formează aminoacidul lizinalanina.

Se produce întâi dehidrogenarea carbonului β de la serină, formându-se dehidroalanina, care la rândul său reacționează cu un rest de lizină:

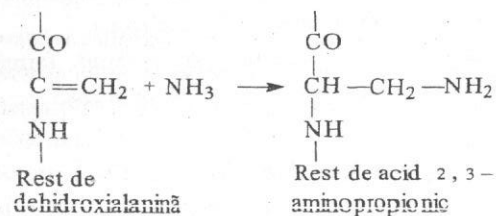




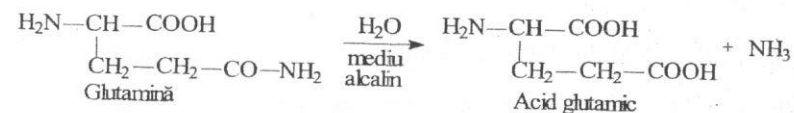
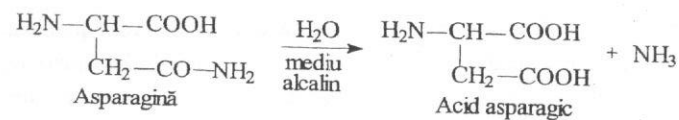
Lizinalanina se poate forma și la tratarea, în mediu acid, a keratinei, când o parte de cisteină se transformă în dehidroalanină, care reacționează în continuare cu un rest de lizină:



În hidrolizatele proteice tratate alcalin s-a identificat acidul 2,3-diaminopropionic, care se formează din resturile de dehidroalanină prin interacțiunea cu amoniacul rezultat la hidroliza părții amidice a lanțurilor laterale din molecula de collagen sau a grupelor amidice de la asparagină și glutamină:



Soluțiile diluate de alcalii duc la scăderea azotului amidic din collagen și la formarea de amoniac liber, așa cum se întâmplă la cenușărirea pieilor. Glutamina și asparagina se transformă în acid glutamic și acid asparagic:



Într-un lanț polipeptidic din molecula de collagen sunt circa 120 resturi de acizi dicarboxilici dintre care 25-30% au grupa carboxilică amidificată. Distrugerea acestei grupe amidice contribuie la deplasarea pH_i a collagenului nativ la valori de 5,0-5,5.

Grupa guanidinică a argininei, în mediu alcalin, se descompune cu formare de ornitină și uree.

Modificări privind legăturile intramoleculare. Printre factorii de stabilitate existenți în molecula de collagen, un rol deosebit îl au legăturile intramoleculare: legăturile de hidrogen și legăturile covalente.

Legăturile de hidrogen constituie cea mai mare parte a conectărilor dintre lanțurile polipeptidice, în cadrul aceluiași lanț sau între lanțuri diferite. Având în vedere că valoarea energiei de legătură este mică, ruperea legăturilor de hidrogen se face cu un consum mic de energie. Ele se rup la denaturarea collagenului sub influența temperaturii, a alcaliilor, a soluțiilor concentrate de acizi, a unor substanțe ca ureea, guanidina etc.

Acizii în soluții diluate și mai ales acizii organici, cu constantă de ionizare mică, nu rup legăturile de hidrogen. Dacă cauza care a produs ruperea legăturilor de hidrogen încetează, în collagen se formează noi legături de hidrogen.

Legăturile covalente sunt cele din lanțurile polipeptidice și de asemenea, acelea care formează dimerii și trimerii, β și γ, din moleculele de collagen (legături aldolice și aldiminice), precum și legături intermoleculare.

Legăturile covalente ale collagenului sunt rezistente la acizi și baze în soluții diluate și se rup la hidroliza cu soluții concentrate de acizi și baze, în timp mai îndelungat sau sub influența temperaturii. Legăturile care cedează

mai întâi sunt cele esterice și apoi legăturile peptidice.

Modificări produse de acizi și baze asupra moleculei de colagen, asupra fibrililor și fibrelor. Molecula de colagen are o rezistență bună față de acizi și alcalii. Atâta vreme cât nu se produc efecte de hidroliză care să afecteze integritatea lanțurilor polipeptidice, mai ales în mediu alcalin, se păstrează structura triplului helix.

Acizii și bazele puternice, mai ales sub formă de soluții concentrate, produc *denaturarea* macromoleculei de colagen, care își pierde proprietățile caracteristice.

Prin umflarea în soluții acide sau alcaline, fibrilele de colagen își pierd conturul neted și capătă o răsucire sinusoidală.

În mediu alcalin, fibrilele se pot scinda longitudinal, iar protofibrilele se răsucesc unul în jurul altuia, ca într-o funie. Astfel se poate explica afânarea pielii la cenușărire.

O fibrilă cu capetele libere dintr-o fibră izolată, prin umflare, își modifică lungimea, micșorându-se cu până la o treime din lungimea inițială și în același timp crește în grosime.

În cazul fibrilelor din țesutul conjunctiv, care nu prezintă capete libere, scurtarea este redusă. Desfacerea fibrilelor în protofibrile este provocată de ruperea legăturilor transversale, care duce la o umflare din ce în ce mai mare și se poate ajunge, în cazuri extreme, la solubilizarea colagenului sub formă de gelatină.

12.4.6. INFLUENȚA SĂRURILOR NEUTRE ASUPRA COLAGENULUI

În soluțiile de colagen, în prezența sărurilor neutre provenite de la acizii tari sau bazele tari, la pH_i , vâscozitatea și gradul de umflare a colagenului sunt dependente de natura și concentrația sării (Fig. 12.41).

La concentrații reduse în clorură de sodiu de până la 1,5–2,0%, colagenului din soluție îi cresc vâscozitatea și umflarea, fenomen numit *dizolvare salină*.

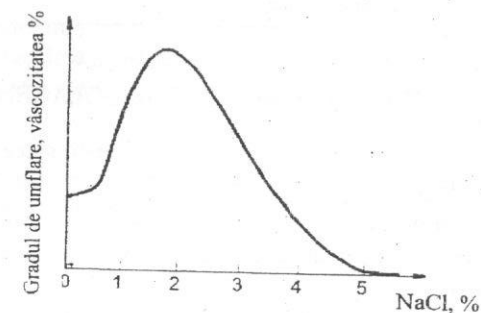
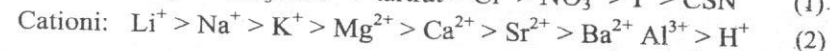


Fig. 12.41. Variația vâscozității și a gradului de umflare a colagenului din soluție în funcție de concentrația în NaCl [136].

Cu creșterea, în continuare, a concentrației în clorură de sodiu vâscozitatea și umflarea scad, fenomen denumit de *salifiere*, ajungându-se până la precipitarea colagenului. Dizolvarea salină se produce pe seama ionilor de sare hidratați, care se leagă de colagen prin intermediul moleculelor de apă, prin legături de hidrogen și van der Waals [136].

Salifierea este considerată ca un proces de deshidratare ce se manifestă la concentrații mari de NaCl, prin faptul că pentru a se produce disocierea sa con-sumă apa de solvatare a colagenului.

După puterea de scădere a umflării și a vâscozității colagenului din soluție cu creșterea concentrației sărurilor anorganice frecvent folosite, acestea pot fi aranjate în următoarea ordine descrescătoare a acțiunii lor după anionii și cationii pe care îi conțin, astfel:



Acțiunea cea mai puternică de dizolvare salină o au cationii în ordinea inversă a seriei liotrope de salifiere [113], deoarece mai multe molecule de apă se leagă de cationi și aceasta permite formarea unui număr mai mare de legături de hidrogen cu colagenul și, implicit, solubilizarea acestuia.

12.4.7. INFLUENȚA OXIDANȚILOR ASUPRA COLAGENULUI

Oxigenul atomic și molecular, ozonul, combinațiile anorganice de tip oxo (R_1-O-R_2), substanțele organice și anorganice de tip peroxo ($R_1-O-O-R_2$), precum și sistemele anorganice de tip redox produc oxidarea colagenului [136, 137, 133]. Oxidarea poate avea loc asupra colagenului în mediu apos, cât și asupra colagenului uscat.

În funcție de intensitatea procesului, la oxidarea colagenului au loc:

- modificări ale aminoacizilor;
- modificări ale aminoacizilor și ruperi de legături peptidice;
- degradarea completă a colagenului.

Dintre tipurile principale de reacții de oxidare propriu-zisă ale colagenului sunt date în figura 12.42.

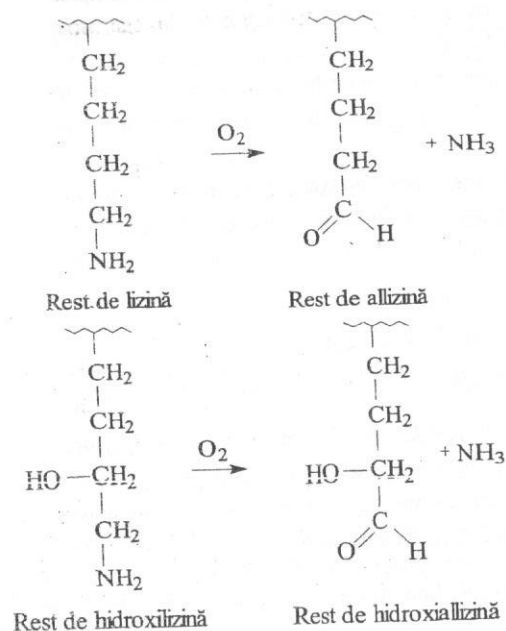


Fig.12.42. Tipuri de reacții de oxidare ale colagenului

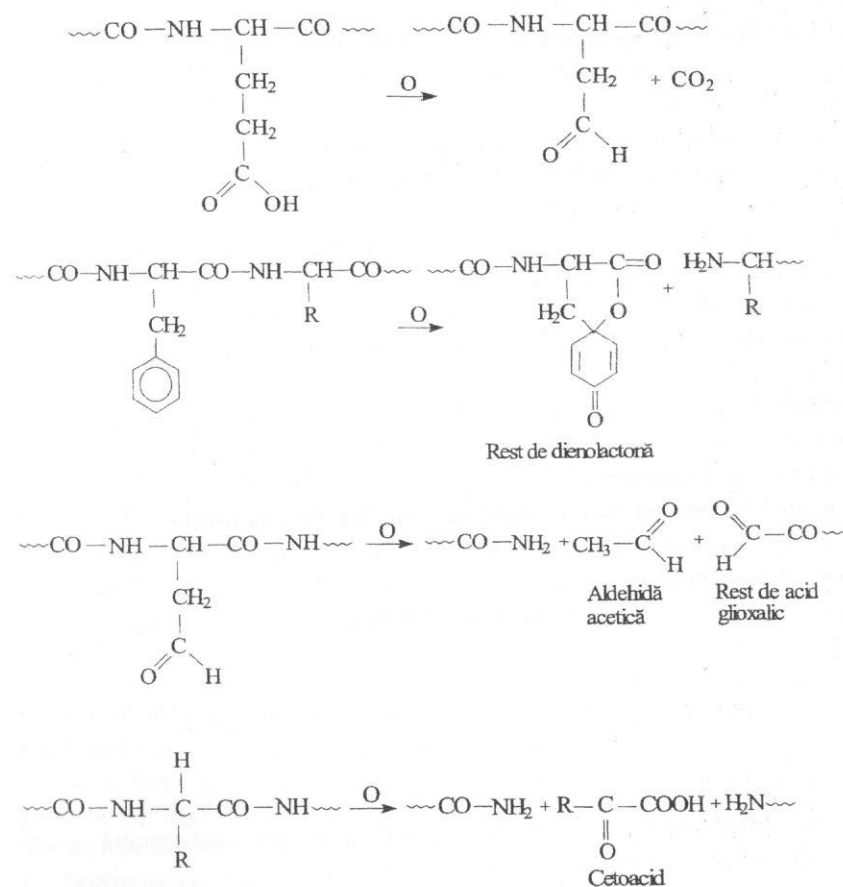
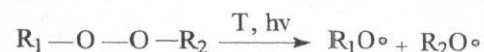


Fig.12.42. Tipuri de reacții de oxidare ale colagenului (continuare)

Combinațiile peroxo și sistemele redox formează în mediu apos radicali și ioni radicali. Combinațiile peroxo generează radicali prin descompunere, cu aport de energie termică sau radiantă [136]:



În reacțiile de oxido-reducere, colagenul, în soluție, înregistrează pierderi de masă prin solubilizare. Intensitatea solubilizării este dependentă de compoziția și concentrația sistemului redox. Astfel, mărirea proporției de apă oxigenată intensifică procesul de solubilizare.

Lanțurile polipeptidice β și γ din colagenul solubil sunt mult mai susceptibile la solubilizare decât lanțurile α . La temperaturi joase ($< 10^\circ\text{C}$), oxidarea colagenului are ca efect producerea unor reacții de reticulare prin intermediul funcțiilor aldehydice rezultate din transformări polimer-analoage, fapt confirmat de reducerea solubilității colagenului [139].

Colagenul impurificat cu glucide sau glicozaminoglicani, prin oxidare, se insolubilizează mai puternic, ca urmare a formării unor grupări aldehydice la nivelul acestor zaharide [140]. Cu 1-3% agent de oxidare, raportat la cantitatea de colagen solubil, nu are loc ruperea catenelor polipeptidice, la pH slab acid și la temperatură sub 30°C . La peste 3% agent de oxidare începe să aibă loc ruperea legăturilor peptidice.

12.4.8. UMFLAREA COLAGENULUI

Nu este nici o teorie cu privire la umflarea unui polimer cristalin. Cu toate acestea, pentru o rețea amorfă, după teoria Flory-Huggins (113,141,142,143), în cazul soluțiilor de polimeri și teoria elasticității cauciucului, se ajunge la următoarea ecuație pentru echilibrul fracțiunii de volum a polimerului în gelul umflat:

$$\left(\frac{RT\rho}{Mc} \cdot \frac{\bar{r}_i^2}{\bar{r}_o^2} \right) V_1 \left(v^{1/3} - v \frac{\bar{r}_o^2}{\bar{r}_i^2} \right) = -[\ln(1-v) + v + x_1 v] \quad (1)$$

unde:

R – constanta gazelor;

T – temperatura absolută;

ρ – densitatea polimerului;

Mc – greutatea moleculară a polimerului;

$\bar{r}_i^2 / \bar{r}_o^2$ – raportul între media pătrată a distanțelor dintre lanțurile reticulate și cele libere;

v – fracția de volum a polimerului;

V_1 – volumul molecular al diluanților;

x_1 – parametrul energiei libere, care poate fi definit ca:

$$x_1 = \frac{F_m^*}{kTn_1\xi} \quad (2)$$

unde:

F_m^* – excesul de energie liberă la amestecare;

k – constanta lui Boltzmann;

n_1 – numărul moleculelor de dizolvant și fracțiunea de volum a polimerului (dintre două simboluri v și ξ folosite pentru a exprima fracțiunea de volum a polimerului, numai v se va referi la condițiile de echilibru a gelului umflat într-un exces de dizolvant).

Un parametru corespunzător entalpiei, k_1 , poate fi definit astfel:

$$k_1 = \frac{\Delta \bar{h}_1}{RT\xi} \quad (3)$$

și se poate prezenta simplu după ecuația (1):

$$k_1 = -T \frac{\delta x_1}{\delta T} \quad (4)$$

Măsura lui v și a coeficientului său de temperatură, împreună cu cunoașterea modulului cauciucului din teoria elasticității, permit conform ecuațiilor (1) și (4) o evaluare a parametrului termodinamic de diluție x_1 și a componentului său de entalpie k_1 .

Ecuația (1) se bazează pe teoria strict valabilă pentru o rețea de polimer în prezența unui diluant monocomponent. Extinderile la un diluant multicomponent pot fi făcute riguros prin introducerea fiecărui parametru de interac-

țiune.

12.4.8.1. UMFLAREA OSMOTICĂ

Dacă o structură fibroasă de colagen, așa cum ar fi de exemplu dermul, aflat în echilibru cu apa pură, deci la pH_i , este introdusă în într-o soluție de acid sau bază, se constată că gradul de hidratare crește în raport cu cel inițial, are loc umflarea.

Modificarea gradului de umflare a dermului de bovine, în funcție de pH , sub acțiunea acizilor și bazelor este prezentată în în figura 12.43. Curbele arată că gradul de umflare este influențat de starea de afânare a țesutului dermic, deoarece hidratarea este frânată mecanic, la un moment dat, de structura histologică a țesutului colagenic.

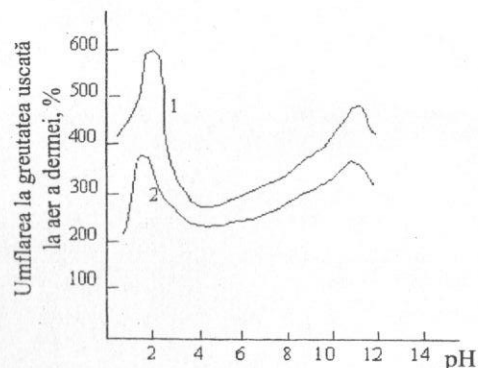


Fig. 12.43. Gradul de umflare a colagenului în funcție de pH .
1. derm de bovine cu structură afânată; 2. derm de bovine cu structură deasă.

Intensitatea umflării colagenului este în funcție de starea încărcării moleculelor sale. Dacă se face o modificare dirijată a lanțurilor sale polipeptidice printr-o reacție chimică, ca de exemplu în cazul metilcolagenului, se constată o creștere considerabilă a capacității de umflare în mediu acid. Cresc puternic forțele de respingere intermoleculară dintre moleculele de colagen, ceea ce

duce la creșterea umflării.

În cazul unei dezaminări se întâmplă același lucru. În această situație, molecula posedă un exces de încărcare negativă, ceea ce face ca în mediu bazic să aibă loc o umflare însemnată.

Umflarea este mai puternică, în cazul în care disocierea grupelor reactive este mai mare. Dacă se urmărește curba de umflare, se constată că la pH neutru umflarea este mică, întrucât în domeniul polar al moleculei de colagen se găsesc grupe carboxilice negative și grupe aminice pozitive complet disociate.

La punctul izoelectric, încărcarea este zero.

Prin scăderea pH -ului, tot mai multe grupe carboxilice sunt descărcate alterându-se, astfel, compensarea forțelor de respingere, ducând la umflarea colagenului.

Ridicând pH -ul în jurul valorii 9, se obține, mai întâi, o descărcare a grupelor ϵ -aminice ale lizinei. Aceasta duce la creșterea numărului de grupe carboxilice încărcate negativ și, deci, la o încărcare negativă a moleculei. Ca urmare, apar respingeri între molecule, ceea ce generează o umflare ușoară. Abia la $pH=12-13$, 50% din grupele guanidinice, pozitive, sunt descărcate, ducând, în continuare, la creșterea umflării.

Umflarea maximă în mediu acid este la $pH=2,0-2,2$, mai mare decât în mediu alcalin, care este maximă la $pH=11-11,5$.

Minimum de umflare este la pH_i , după care, umflarea crește pe o pantă lină până la $pH=8-9$.

După neutralizarea acidului sau a bazei care a provocat umflarea, se constată că țesutul colagenic revine aproximativ la gradul de hidratare inițial, fără însă ca reversibilitatea să fie completă, din cauza unor modificări produse asupra structurii colagenului.

Odată cu creșterea gradului de hidratare a țesutului colagenic, conținutul în apă, raportat la dermul uscat, este de 200% la pH_i și de 400-1000% la umflarea maximă acidă sau alcalină.

Suprafața relativă la umflarea maximă este de 0,8-0,9, față de umflarea minimă, la starea izoelectrică de 1,0, iar comportarea la deformare, arată că starea plastică trece în stare elastică.

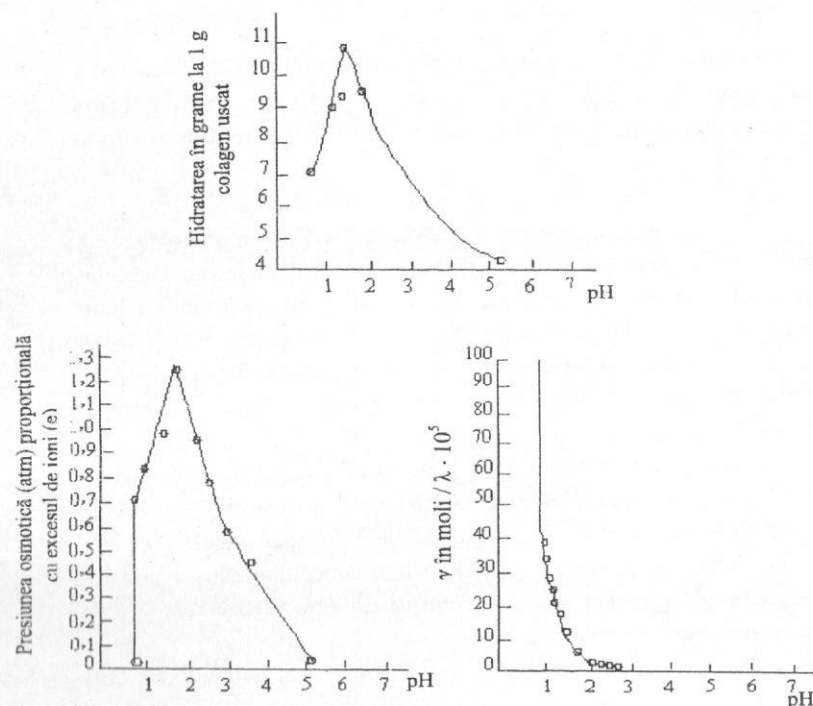


Fig.12.44. Modificările umflării dermului și constanta de echilibru din teoria echilibrului de membrană Donnan, în funcție de pH [144].

La umflarea acidă sau alcalină, fibrele colagenice cresc în secțiunea transversală și se scurtează în lungime.

Dacă se compară curbele care arată dependența gradului de umflare a dermului, în raport cu pH-ul soluției (Fig. 12.43) cu cele ale variației excesului de ioni în funcție de pH (Fig. 12.44.), ($e = 2y + y - 2x$ [14], (subcap. 12.4.2.) din teoria echilibrului de membrană Donnan, se poate constata că există o concordanță.

Această concordanță a fost folosită de Procter și Wilson pentru elaborarea teoriei osmotice a umflării.

Conform acestei teorii, datorită excesului de ioni din interiorul dermului, apa poate pătrunde, deoarece presiunea osmotică creată, în funcție de pH, este proporțională cu valoarea excesului de ioni (e).

S-a dovedit că există o serie de alte fenomene care nu pot fi explicate prin teoria osmotică a umflării.

Astfel, conform legii lui van't Hoff, presiunea osmotică din soluțiile diluate este direct proporțională cu concentrația și temperatura absolută.

Dacă umflarea s-ar datora numai presiunii osmotice, ar trebui ca o dată cu creșterea temperaturii, să crească și gradul de umflare. Experiențele efectuate pe collagen au arătat că gradul de umflare scade cu temperatura.

Dacă umflarea s-ar datora numai presiunii osmotice, ar trebui ca volumul dermului să crească constant, însă s-a arătat mai înainte că datorită rezistențelor mecanice ale structurii fibroase ale collagenului, umflarea nu corespunde presiunii osmotice.

S-a arătat, de asemenea, că la umflare se produce o scurtare și o îngroșare a fibrelor colagenice.

Are loc deformarea catenelor polipeptidice care alcătuiesc molecula de collagen, care poate fi explicată prin suprimarea sarcinii grupelor carboxilice ale catenelor laterale ale lanțurilor polipeptidice în mediu acid și a sarcinii grupelor bazice în mediu alcalin, conform figurii 12.45.

Aceasta înseamnă că, în mediu acid sau alcalin, rămân în structură sarcini cu același semn, care se resping electrostatic, producând deformarea catenelor moleculare ale structurii.

Respingerea electrostatică are loc în mediu apos, acid sau bazic.

Moleculele de apă, având caracter bipolar, intră suplimentar în reacție cu catenele încărcate din structura collagenului și determină hidratarea suplimentară.

Se poate concluziona că umflarea în mediu acid sau alcalin este o consecință a factorilor osmotici și electrostatici care acționează în același sens.

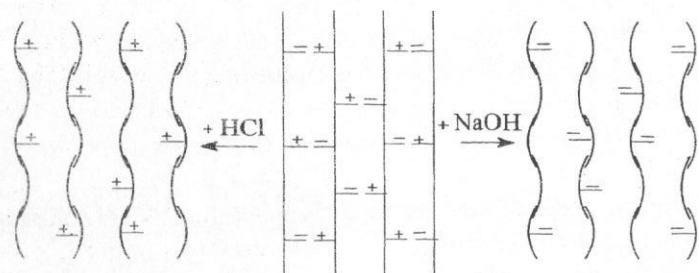


Fig.12.45. Prezentarea schematică a scurtării și îngroșării fibrelor colagenice în procesul de umflare datorită respingerii electrostatice

12.4.8.2. UMFLAREA LIOTROPĂ

Este bine cunoscut că la stabilizarea colagenului contribuie rețiculările prin intermediul legăturilor de hidrogen.

La tratarea cu acizi, baze, săruri, are loc o perturbare a acestei stabilități până la nivelul α -helixurilor din macromolecula de colagen, care se manifestă prin scăderea temperaturii de contracție, a solubilizării, de multe ori considerabile, a colagenului și prin creșterea cantității de apă adsorbită.

Fiecare tip de reactiv produce efectele sale liotrope caracteristice, a căror generalizare depășește orice aspect chimic sau de conformație a structurii macromoleculare și nici o explicație bazată pe vreo însușire specială a unei macromolecule oarecare nu este absolut corectă.

În general, perturbarea lanțurilor polipeptidice de către agenții liotropi au drept rezultat o adsorbție mai mare de apă decât în condiții normale și se produce o mărire a distanțării dintre grupările rețiculate, intercatenare.

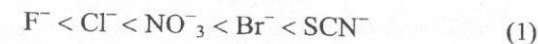
În contrast cu umflarea osmotică, prin care fibrele colagenice pot deveni transluide (s-a arătat că starea plastică se poate transforma în stare elastică), la umflarea liotropă nu se constată nici o alterare a aspectului opac natural al acestora. Gradul de umflare liotropă este mult mai mic în comparație cu umflarea osmotică, iar modificările dimensiunilor fibrelor de colagen sunt neînsemnate.

Umflarea osmotică și cea liotropă pot avea loc simultan. K.H. Gustavson evidențiază efectul de umflare liotropă alături de umflarea osmotică, luând drept exemplu acidul acetic și acidul clorhidric, ambii sub formă de soluții la pH=2.

Acidul acetic provoacă o adsorbție de apă a colagenului cu 50% mai mare decât în cazul acidului clorhidric și solubilizează de 8 ori mai mult colagen. În cazul acidului acetic gradul de dezorganizare a structurii moleculare a colagenului este mult mai mare decât la acidul clorhidric. Aceasta face ca temperatura de contracție a colagenului să scadă cu 12°C la tratarea cu acid acetic și numai cu 5°C în cazul acidului clorhidric. Toate acestea demonstrează că umflarea produsă de acidul acetic este fundamental diferită de cea produsă de acidul clorhidric.

Umflarea liotropă poate fi evidențiată și în soluțiile de săruri unde forțele osmotice ale lui Donnan sunt neglijabile. În general, ea poate fi observată la orice pH, numai dacă concentrația sării este suficient de mare (adică > 0,5 M), iar în intervalul neutru al pH-ului (6-8), chiar la o concentrație a sării relativ mică. O caracteristică generală este că gradul de umflare întâi crește și apoi descrește la creșterea concentrației sării.

Ordinea anionilor și a cationilor privind comportarea la umflare sau dezumflare este:



Umflarea-dezumflarea ar putea fi atribuită alternativ capacității posibile a solventului de a desface legăturile intermoleculare la concentrație scăzută în sare (Cs) și de a le reface într-un oarecare fel la (Cs) mare.

În prezența unor agenți puternici de sărare, cum ar fi KSCN, gradul deordonare a structurii colagenului se reduce. În zonele care au oordonare și o stabilitate mai redusă, cum sunt zonele cu catene laterale puternic polare, se poate produce o dezorganizare completă la concentrații mici de săruri sau a variațiilor de pH.

Alcoolii alifatici provoacă întotdeauna o reducere a gradului de umflare în raport cu valoarea determinată în apă pură. Efectul este ilustrat în figura 12.46. pentru pelicule de collagen obținute prin turnarea unei dispersii de tendoane de vițel și reticulate cu p-benzochinonă.

Gradul de umflare a membranei de collagen scade cu concentrația în alcoolii în ordinea $\text{CH}_3\text{OH} > \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} > \text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$; aceasta demonstrează afinitatea alcoolilor puri față de collagen.

În general, efectul liotrop este cel mai pronunțat în soluțiile neutre.

În cazul acizilor slabi, cum ar fi acidul acetic, acțiunea agenților liotropi este legată de molecule și nu de ioni și, în consecință, este necesară prezența ionilor în echilibru cu cantitățile mari de acid neionizat, adică valori mici ale pH-ului.

Acțiunea liotropă a hidroxizilor se manifestă la alcalinitate mare.

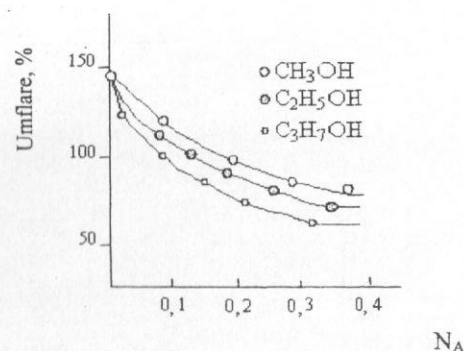
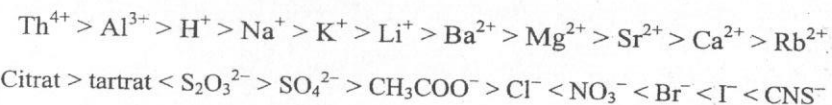


Fig. 12.46. Variația umflării membranei de collagen reticulat în funcție de concentrația în alcool exprimată în fracții molare N_A , la 20°C și $\text{pH} \approx 6$. 1. CH_3OH ; 2. $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$; 3. $\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$.

Sărurile neutre au acțiune puternic liotropă la pH-ul izoelectric al collagenului.

Sărurile liotrope sunt electroliți care ionizează în apă și sunt adsorbite polar de collagen fără schimb ionic. La adsorbția ionilor de același semn se stabilește o ordine de „tărie” a adsorbției numită *serie liotropă*.

Seriile liotrope ale adsorbției cationilor și anionilor sunt următoarele:



În general, sărurile ale căror ioni au o slabă tendință de hidratare, de exemplu tiocianatii, sunt puternic adsorbite de către collagen în soluție apoasă, în timp ce sărurile a căror ioni se hidratează puternic, cum ar fi sulfatii, manifestă o adsorbție negativă, datorită efectului lor deshidratant asupra collagenului.

Astfel, tiocianatul de sodiu este puternic adsorbit de către collagen și la concentrații care depășesc 1 M, produce un efect intens de umflare a collagenului, precum și solubilizarea sa parțială.

O soluție de 2 M produce o umflare triplă comparativ cu conținutul inițial de apă al collagenului nativ, iar temperatura de contracție coboară până la aproximativ 20°C . O soluție de sulfat de sodiu 1 M nu provoacă nici cea mai mică dizolvare a collagenului, în timp ce temperatura de contracție este ușor crescută.

Efectul liotrop al sărurilor neutre se manifestă mai ales la concentrații ridicate și se datorează, în principal, moleculelor de sare și nu ionilor.

Sărurile cu efectul liotrop cel mai pronunțat sunt acelea care în soluții concentrate sunt numai parțial ionizate, cum sunt clorurile de metale bivalente (Ca, Mg, Ba).

J.A. Wilson este cel care semnalează pentru prima dată că soluțiile de săruri neutre, cum sunt cele de clorură de calciu, adăugate în concentrație mare, produc degradarea collagenului.

S-a constatat că toate halogenurile sunt capabile de a aduce collagenul în soluție, iar sulfatii și tiosulfatii inhibă degradarea collagenului. Clorurile de litiu, potasiu și magneziu au un efect distructiv sporit asupra collagenului o dată cu creșterea concentrațiilor soluțiilor. Clorura de calciu are efect de distrucție maxim sub formă de soluție de 2–3 M, iar iodura de sodiu în soluție de 2 M are acțiunea cea mai puternică de distrucție.

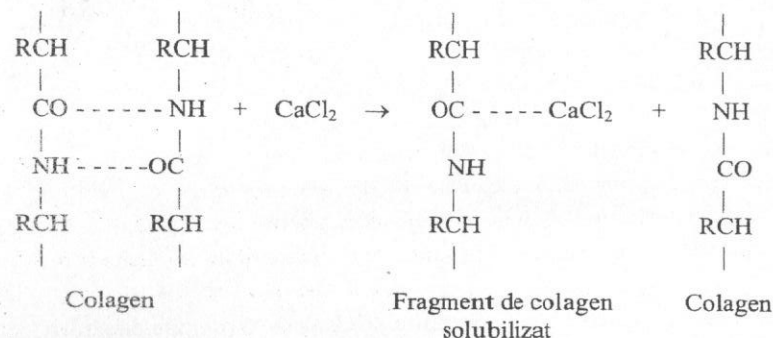
În soluții saturate de sulfat de sodiu, nu are loc distrucția collagenului, nici după 170 de zile la temperatura de 37°C , pe când mai mult de 30% din cola-

genul inițial se pierde din proba păstrată în apă, acoperită cu tolue și peste 80% în soluție de clorură de magneziu.

A.W. Thomas și J.A. Wilson folosesc termenul de hidroliză pentru a descrie efectul distructiv al sărurilor liotrope asupra colagenului. De fapt, nu are loc o hidroliză deoarece nu se produce o scindare a legăturilor covalente în decursul solubilizării colagenului.

K.H. Gustavson este de părere că solubilizarea este cauzată de ruperea legăturilor de hidrogen și de tip van der Waals.

Sărurile neutre, cu potențial coordinativ, pot produce ruperea legăturilor de hidrogen, astfel:



Intensitatea de acțiune a sărurilor depinde de interacțiunea dintre sare și colagen și de stabilitatea compusului de valență secundară format între sare și proteină. Compușii sare-colagen se pot desprinde din masa totală a colagenului și să treacă în soluție.

Sărurile bazice de crom cationice, taninurile vegetale, acizii și bazele reacționează la fel cu colagenul tratat cu diferite săruri neutre, ca și cu cel netratat.

Pentru a se dovedi afirmațiile anterioare, R. Pfeiffer și Z.J. Würgler au tratat pudră de piele, timp de 14 zile, la temperatura camerei, la pH = 5,7 – 6,0, cu tolue și cu soluție de 1M de diferite săruri neutre și au determinat cantitatea de colagen trecut în soluție. Eșantioanele de pudră de piele au fost spălate de săruri și deshidratate cu acetonă. Câte 1,8g de pudră de piele deshidratată s-au

tratată cu câte 200ml soluție de 0,01 M acid sulfuric, timp de 12 ore, după care s-a măsurat pH-ul. S-a constatat că probele de pudră de piele, deși au suferit diferite grade de degradare, au avut aceleași valori de pH, deci, capacitatea de legare a acidului este aceeași (tabelul 12.18).

Eșantioane de pudră de piele tratate cu săruri neutre, spălate și deshidratate, folosind aceeași metodologie ca mai sus, au fost tratate cu săruri bazice de crom.

Tabelul 12.18.

Tratarea pudrei de piele cu 1 M soluții de săruri neutre

Sarea neutră	Colagen trecut în soluție %	pH-ul după tratarea cu 0,01 M H ₂ SO ₄
—	4,0	2,62
Na ₂ SO ₄	1,6	2,62
Na ₂ S ₂ O ₃	1,2	2,62
MgSO ₄	1,6	2,62
NaCl	7,8	2,61
KCl	7,0	2,62
MgCl ₂	9,3	2,62
KBr	14,4	2,62
KI	16,8	2,63
BaCl ₂	14,9	2,63
SrCl ₂	21,1	2,62
CaCl ₂	31,9	2,62
KSCN	24,0	2,63

Combinarea compușilor de crom, de diferite tipuri, este ilustrată în datele tabelului 12.19.

Soluțiile au conținut 0,5 echiv. de crom / l, iar timpul de tratament a fost de 48 ore. Soluțiile I și II de săruri de crom cu o bazicitate de 33,3% au conținut aproape în întregime crom cationic. Soluția III cu o bazicitate de

33,3%, a conținut 80% complecși de crom cationici, 15% neîncărcați electric și 5% anionici.

Tabelul 12.19.

Combinarea compușilor de crom cu pudra de piele pretrată
cu soluții de 1 M săruri neutre

Sare neutră	I Sulfat bazic de Crom cu 33,3% bazicitate	II Clorură bazică de crom cu 33,3% bazicitate	III Sulfat bazic de crom cu 50% bazicitate
—	11,6	5,2	23,7
Na ₂ SO ₄	11,4	5,1	18,2
NaCl	11,6	5,1	24,2
KBr	11,8	5,4	26,5
KI	11,9	5,5	30,8
KSCN	12,0	5,6	32,2
SrCl ₂	11,8	5,4	27,1
BaCl ₂	11,7	5,3	28,3
CaCl ₂	11,8	5,4	20,8

Complecșii de crom cationici din soluțiile I și II reacționează inițial cu ionii carboxilici ai colagenului prin legături electrovalente și apoi prin legături covalente și de coordinație. Complecșii de crom, neionici și anionici, se fixează de collagen prin intermediul grupelor aminice.

Datele din tabelul 12.19. arată că tratarea cu săruri neutre a pudrei de piele nu are nici un efect asupra fixării complecșilor de crom cationici.

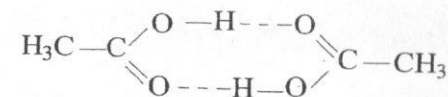
Ureea. Efectul soluțiilor concentrate de uree asupra colagenului este în multe privințe similar celui cu săruri neutre. Colagenul tratat cu o soluție de 4–6 M uree, la temperatura camerei, produce o slabă umflare și afânare.

Crescând temperatura până la 35°C, colagenul se umflă puternic, îi scade temperatura de contracție și îi crește afinitatea. Ureea fiind un compus polar, rupe legăturile de hidrogen intracatenare, de la grupele peptidice, ca urmare a interpunerii sale.

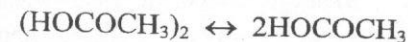
Tratând bucăți de piele gelatină de vițel cu o soluție de uree de 6 M, timp de 24 ore, la temperatura de 35°C, se solubilizează cam jumătate din collagen. Restul de piele gelatină este puternic umflată, se combină cu aproximativ aceeași cantitate de crom cationic, la tratarea cu săruri bazice de crom, ca și pielea gelatină netrată cu uree, în schimb, se fixează cu 60% mai mulți complecși bazici de crom neionici și cu 35% mai multă substanță tanantă din extractul de mimoza.

Acidul acetic. Efectul liotrop al acidului acetic, ca și al altor acizi carboxilici, este de natură moleculară ca și în cazul ureei.

Acidul acetic, ca și alți acizi carboxilici manifestă o tendință pronunțată de asociere. Formarea de dimeri ai acizilor carboxilici este cauzată de legăturile puternice de hidrogen formate de atomul de oxigen al grupării carboxilice. Dimerul acidului acetic are forma următoare :



Forma dimerică a acidului acetic are un grad redus de ionizare. În cazul soluțiilor de acid acetic de 2–3M, acidul acetic este mai mult de 99% sub formă de molecule, din care o cantitate considerabilă este sub formă de dimeri. Deci, în astfel de sisteme, echilibrul vizează în principal reacția:



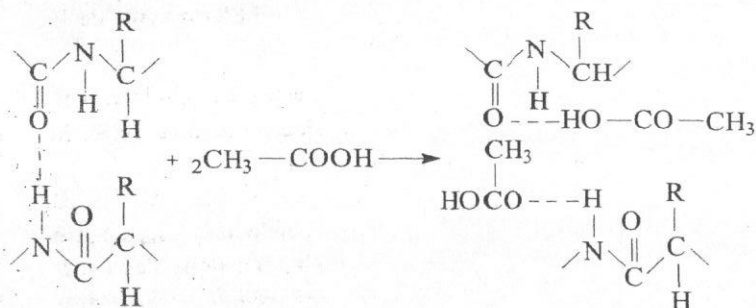
cu locurile pentru legăturile de hidrogen disponibile în monomer.

La aceeași valoare de pH, o soluție de acid acetic produce o umflare mai puternică și o solubilizare mai avansată a colagenului decât alți acizi izovalenți organici sau anorganici.

La tratarea cu soluție de acid acetic, de 2–3 M, se produce o oarecare deaminare a colagenului, care înseamnă o creștere a conținutului de grupe carboxilice în raport cu grupele aminice.

Ruperea legăturilor de hidrogen de la grupările CO și NH și interpunerea acidului acetic, produc dezorganizarea structurii și solubilizarea colagenului. La îndepărtarea acidului acetic, locurile rămase libere sunt preluate de moleculele de apă. Are loc o creștere a hidratării colagenului și mărirea capacității sale de reacție.

Ca și în cazul altor agenți liotropi, principala acțiune de degradare a colagenului la tratarea cu acid acetic se referă la ruperea legăturilor de hidrogen. Tendința puternică a moleculelor de acid acetic de a forma legături de hidrogen cu colagenul se reprezintă astfel:

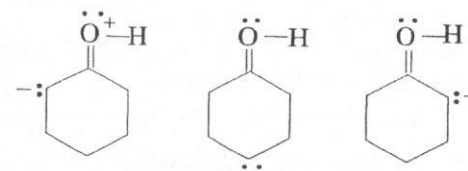


Efectele liotrope ale acizilor carboxilici asupra colagenului sunt interdependente de puterea de legare a moleculelor acizilor. Degradarea principală care provoacă labilizarea catenelor, solubilizarea și scăderea temperaturii de contracție a colagenului este slăbirea și ruperea legăturilor de hidrogen.

Acțiunea liotropă a fenolilor. Fenolul are o constantă de ionizare de $1,7 \cdot 10^{-10}$, care este cu mult mai mare decât cea a alcoolilor alifatici.

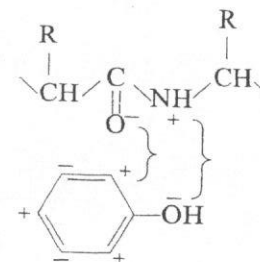
Interacțiunea fenolului cu colagenul constă în formarea de legături de hidrogen între moleculele de fenol și colagen la grupele sale peptidice, producându-se, în același timp, dezorganizarea catenelor polipeptidice și solubilizarea parțială a colagenului.

Pauling atribuie acest fapt structurilor care dau atomului de oxigen o sarcină pozitivă:



Deci, condițiile sunt favorabile pentru a avea loc formarea de legături de hidrogen la molecula de fenol.

După A.Küntzel asocierea fenolului cu colagenul are loc conform formulei:



Efectul liotrop al anionilor. Anionii multor acizi carboxilici aromatici sau sulfonici, în special, acei care au și grupe hidroxilice (exemplu, salicilatul de sodiu), produc efecte liotrope foarte puternice. Ei sunt mult mai activi când provin de la săruri cu metalele alcaline, foarte ionizate.

Acțiunea anionilor asupra colagenului este legată probabil de o interacțiune electrostatică indirectă cu legătura peptidică, care duce la degradarea consecutivă a legăturilor de hidrogen intermoleculare.

Tanantii sintetici de tipul acizilor sulfonici manifestă acțiuni liotrope în soluție neutră sau slab acidă. De regulă, tananții sulfonici acizi au acțiune de fixare a colagenului și cei sub formă de sare, de labilizare.

Acțiunea liotropă a substanțelor tesioactive. Pentru a se constata efectul agenților activi de suprafață asupra colagenului, s-a determinat temperatura de

contractie, la diferite valori de pH, a pieilor crude de bovine. S-a constatat că efectul liotrop asupra colagenului a unor astfel de agenți este puternic dependent de valoarea de pH.

S-a observat că detergenții ionici au un efect liotrop mai pronunțat în cazul în care atât colagenul, cât și agentul activ de suprafață au aceeași sarcină, fapt ce demonstrează că efectul liotrop nu depinde de afinitatea agentului și a colagenului.

Acțiunea amestecurilor de apă/solvent asupra colagenului. Un solvent organic poate să aibă acțiune de stabilizare sau de denaturare și în unele cazuri de degradare asupra colagenului.

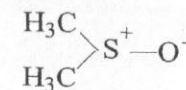
Sistemele apă-metanol măresc temperatura de denaturare a colagenului în soluții care conțin peste 65% metanol [145, 146]. Dimpotrivă, amestecurile apă-amidă, apă-alcooli clorurați și apă-dimetilsulfoxid diminuează considerabil temperatura de denaturare [147, 148, 149, 150, 151].

Este cunoscut faptul că apa pură, la temperaturi cuprinse între 20°C și 60°C este constituită din ansambluri de molecule de apă legate prin punți de hidrogen. De asemenea, de la 20°C la 0°C, aceste ansambluri se agregă, în timp ce la peste 60°C ele sunt distruse progresiv, eliberând moleculele de apă care rămân independente.

Proprietățile ionilor în soluție apoasă depind de hidratarea lor. În funcție de densitatea sarcinii pe unitatea de suprafață a ionilor, pot fi luate în considerare două structuri de hidratare după teoria lui H.S. Frank [152, 153]:

a. Ionii a căror sarcină electrostatică este aproximativ egală cu cea a ionilor Na⁺ și F⁻ sunt înconjurați de un strat monomolecular format din molecule de apă puternic legate, formând o regiune denumită A sau de *hidratare pozitivă*. Din această cauză, acești ioni nu influențează constanta dielectrică macroscopică decât prin fracțiunea de apă cu care ei sunt deplasați.

Astfel, dimetilsulfoxidul (DMSO), care reacționează ca un ion dipolar, posedă o sarcină negativă localizată la atomul său de oxigen, echivalent cu cel al ionului de fluorură :



Când se adaugă DMSO într-o soluție apoasă de collagen, se formează, mai întâi, un complex DMSO-2H₂O sau DMSO-3H₂O cu moleculele apei solventului, care nu influențează conformația proteinei, iar temperatura de denaturare rămâne constantă.

Când, însă, toate moleculele de apă ale solventului sunt legate la DMSO (plecând de la aproximativ 40-50% DMSO), acesta din urmă va reacționa fie cu molecule de apă care stabilizează structura helicoidală a colagenului, fie direct cu colagenul. Se pare că acțiunea denaturantă a DMSO provine de la capacitatea sa, destul de puternică, de deshidratare.

b. Dacă sarcina unui ion, pe unitatea de suprafață, este egală sau inferioară celei a ionilor K⁺ și Cl⁻, domeniul de hidratare cuprinde o regiune unică, în care moleculele de apă sunt mult mai libere decât în apa pură.

Acești ioni vor modifica proprietățile soluției, deoarece moleculele de apă din regiunea respectivă vor intra în competiție cu moleculele de apă legate prin legături de hidrogen și care formează aglomerările. Ionii pot acționa, de asemenea, direct asupra legăturilor de hidrogen care stabilizează conformația colagenului.

Ureea și formamida acționează ca ioni dipolari, dar spre deosebire de DMSO, ele formează o regiune de hidratare negativă, la fel ca și apa pură. Grupele aminice de la uree și formamidă se înconjoară cu atomii de oxigen ai moleculelor de apă din aglomerări și ai legăturilor peptidice din lanțurile polipeptidice ale colagenului.

Puterea de denaturare a celorlalte amide (DMF și DMA) este intermediară între cea a DMSO și cea a formamidei.

Se pare că acțiunea amidelor și a DMSO depinde în mod esențial de posibilitatea lor de a reacționa sub formă de ioni dipolari față de moleculele solventului apă și față de moleculele de apă legate de collagen, care contribuie la stabilitatea structurii sale helicoidale. Când concentrația în DMSO și în DMF

depășește 80% în volum, structura helicoidală a colagenului este înlocuită, la temperatura obișnuită, de amestecul de lanțuri polipeptidice α , β și γ prezente în soluție sub formă de ghemuri, cu masa moleculară de 100000, 200000, 300000.

În amestecurile apă-DMF, are loc și o degradare importantă a catenelor polipeptidice, cauzată de ruperea unor legături covalente. Într-un amestec de 98,4% DMF și 1,6% apă, vâscozitatea intrinsecă este de 0,3 dl/g și masa moleculară medie de 60000 (tabelul 12.20).

Tabelul 12.20.

Valoarea vâscozității intrinseci și a masei moleculare medii a fracțiunii acidosolubile a colagenului în amestecurile de apă-DMF și apă-DMSO.

Solventul	$[\eta]$ dl/g	Masa moleculară medie
H ₂ O, 0,1 M acid acetic la 40° C	0,8	155 000
DMSO 0,1 M KNO ₃	1,4	155 000
DMSO 10 ⁻² N HCl (dizolvare directă a fibrilelor de colagen)	1,6	
80 % DMF + 20 % H ₂ O, 10 ⁻² N HCl	1,5	160 000
98,2 % DMF + 10 ⁻² N HCl + 1,6 % apă	0,3	60 000
DMF 10 ⁻¹ N HCl (dizolvare directă a fibrilelor de colagen)	0,4	65 000

12.4.9. TRANZIȚIA HELIX-GHEM

Când o soluție de colagen este încălzită, se produce tranziția netă a moleculelor din forma de helix în cea de ghem. Tranziția poate fi urmărită prin diferite metode, cum ar fi rotația optică și vâscozitatea și poate fi asemănată cu topirea structurii triplului helix.

Dacă soluția este apoi răcită sub temperatura de tranziție, proprietățile caracteristice ale colagenului revin, mai mult sau mai puțin, cu o viteză care depinde de condițiile de lucru. Lungimea moleculei de colagen reformate este mai mică decât cea inițială.

La concentrații mai mici de 0,1 mg/ml ale soluției de colagen sub formă de lanțuri izolate, refacerea helixurilor are loc aproape integral.

La concentrații mai mari, refacerea helixurilor are loc mai încet și mai incomplet.

Cinetica de reacție a formării helixurilor din soluții de concentrații mici este de ordinul I, iar în cazul concentrațiilor mai mari, este aproximativ de ordinul II [154].

Dependența de temperatură a procesului, la concentrații mici, urmează relația propusă de Flory și Weaver [155], conform teoriei nucleației. Adică, logarimul vitezei este proporțional cu $1/T\Delta T$, unde T este temperatura la care a fost măsurată viteza, $\Delta T = T_m - T$, unde T_m este punctul de mijloc al tranziției.

O analiză detaliată a cineticii de ansamblu a reacției intramoleculare a pus în evidență trei etape, care ar explica dependența de temperatură: *nucleația, creșterea și stabilizarea*.

Prima etapă este *nucleația* cu dependență negativă față de temperatură, în concordanță cu teoria nucleației și un proces intermediar de creștere cu dependență pozitivă față de temperatură.

Datorită dependențelor opuse față de temperatură, formarea helixului în acest sistem, este dominată de nucleația la temperaturi mici și de creștere la temperaturi mai mari.

Acest fapt este ilustrat în figura 12.47., pentru un lanț α_1 , din colagenul de piele de șobolan. La formarea helixului contribuie și un proces lent de stabilizare, numai la durate mari.

Începând cu lanțuri dezordonate la concentrație mică, procesul este după cât se pare, intramolecular, prin plierea lanțului și formarea de nuclee compuse din trei segmente de lanțuri.

La concentrații mai mari, interacțiunile interlanț sunt mult mai probabile și pot fi obținute nuclee din trei lanțuri separate. De obicei, agregarea se produce mai departe conducând la produși cu greutate moleculară foarte mare, care conțin regiuni scurte de helix în trei lanțuri și regiuni răsucite dezordonat.

Această structură captează apa și este cunoscută sub denumirea de *gelatină*. La grade mici de modificare a helixurilor și într-un timp corespunzător, se poate obține un produs asemănător cu colagenul nativ. Procesul de nucleație, la concentrație ridicată, ar trebui să prezinte o cantică de ordinul al III-lea.

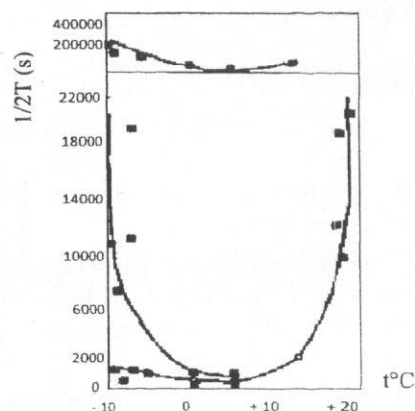


Fig. 12.47. Dependenta de temperatură a vitezei (măsurată în timp de înjumătățire) etapelor de nucleație, creștere și stabilizare în formarea helixului din lanțuri α_1 de colagen de piele de șobolan. Solvent: 0,15 M NaCl, 0,01 M acetat de sodiu și mg/ml etilenglicol.

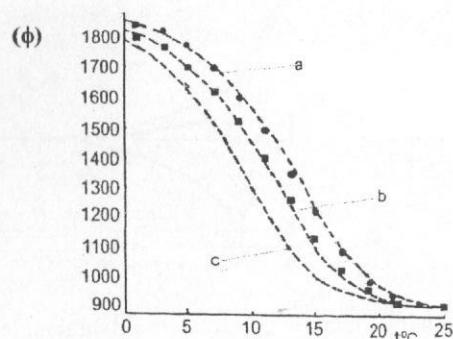


Fig. 12.48. Curbele de echilibru pentru tranziția helix-ghem a lui α_1 -CB-2, în funcție de concentrația soluțiilor: a = 1,44 mM; b = 0,80 mM; c = 0,43 mM. Curbele au fost calculate pentru un echilibru monomer-trimer cu $\Delta H_0 = -93$ kcal/mol de trimer la concentrațiile de mai sus.

Piez și Shermer [156, 157] au reușit să stabilească ordinul de reacție în acest caz la valoarea de 2,8, folosind o peptidă obținută prin scindarea cu bromură de cianogen, α_1 -CB-2, cu 36 de resturi de aminoacizi. Ea a fost transformată reversibil în soluție, la temperaturi mici, într-un produs elicoidal ce greutatea moleculară și dimensiunile moleculei de colagen.

Peptidele mici au proprietatea, neobservată la lanțurile lungi, de a forma helixul într-o manieră complet reversibilă. Curbele de echilibru la tranziția helix-ghem sunt dependente de concentrație (Fig. 12.48.)

12.4.10. COLAGENUL COMPUS SEMICRISTALIN

Investigațiile efectuate prin degradare enzimatică au arătat că structura primară a colagenului este alcătuită din lanțuri polipeptidice în care alternează regiuni „cristaline”, alcătuite din aminoacizi apolari, cu regiuni „amorf” bogate în aminoacizi polari, cu resturi laterale mari.

Comportarea mecanică, fizico-chimică și chimică a colagenului se datorește dualismului structurii sale, cristaline și amorf, înmănunchind proprietățile cristalelor și ale gelurilor.

Proprietăților cristalelor trebuie să li se atribuie stabilitatea relativă a colagenului (dimensională, biologică, chimică, la solvenți etc.), iar proprietăților gelurilor trebuie să li se atribuie elasticitatea, flexibilitatea, reactivitatea etc. Astfel, de exemplu, datorită fericitei coexistențe și capacități de conservare a ambelor structuri, se poate realiza pielea tăbăcită, un material unic, deoarece unice și singulare sunt proprietățile colagenului de *coloid fibrilar* și structura sa histologică specifică.

Din cooperarea acestor efecte, își are originea permeabilitatea sa la vaporii de apă și, în același timp, hidrofobia, elasticitatea dar și impermeabilitatea sa [158, 159, 160].

Transformările fizico-chimice care au loc în piele, în cursul procesului de obținere a pieilor finite, sunt condiționate de structura semicristalină a colagenului și de proprietățile sale coloidale și polielectrolitice.

Pielea proaspătă este atacată după câteva ore de bacterii, atac care se produce direct în zonele amorfale ale colagenului, ele fiind cele mai vulnerabile,

deoarece structura lor necompactă este mai bogată în apă.

Zonele amorfe ale colagenului pot fi asimilate unui gel cu grupe funcționale bine definite și, de aceea, se poate comporta ca o rășină schimbătoare de ioni și ca o sită moleculară în contactul cu tananții, agenții de lubrifiere și cu coloranții.

Această comportare este legată de prezența unor reactivi cu sarcini care au afinitate față de grupele cationice sau anionice ale colagenului, ca și de dimensiunile moleculare ale acestora, referitor la difuzia lor.

Colagenul dă soliditatea mecanică țesutului conjunctiv datorită structurii sale complexe, începând chiar cu structura primară.

Încă din această primă structură, alternează cu regularitate *zonele amorfe*, în care sunt prezenți aminoacizii cu resturi laterale voluminoase, polare, acide sau bazice și *zonele cristaline*, unde sunt prezenți aminoacizii mai puțin polari, ce formează legături de hidrogen intra- și intermoleculare.

Comportamentul mecanic al pielii este diferit de al unui polimer cristalin, semicristalin sau amorf. Acest comportament, împreună cu proprietatea de relaxare la efort, arată că pielea este un material vâscoelastic.

Un astfel de comportament trebuie să se pună în legătură cu coexistența a două țesuturi, dintre care unul este cristalin și, deci, neelasic, tenace (fibrele de colagen), dar dotat cu un înalt grad de suplețe și întărire, și altul elastic (fibrele de elastină).

Ambele țesuturi sunt parte a unei matrici, cu proprietăți vâscoelastice ale unui gel care asigură incompresibilitatea și lubrifierea țesutului, deoarece aici este imobilizată o cantitate importantă de apă (substanța amorfă interfibrilară formată dintr-o rețea tridimensională de mucopolizaharide hidratate).

Comportamentul semicristalin al colagenului se dovedește prin proprietățile sale termice.

Are loc o tranziție de ordinul întâi, care are toate caracteristicile unei tranziții vitroase ($T_g=40^\circ\text{C}$) și se corelează cu temperatura de denaturare ($T_d=37-40^\circ\text{C}$), observată la soluția apoasă pentru moleculele de colagen, *tranziția-ghem*.

Încălzind colagenul, în stare umedă, la peste 67°C , se observă o tranziție de

ordinul doi (temperatura de contracție T_s), însoțită de pierderea totală a cristalinității, când se produce ruperea legăturilor de hidrogen intermoleculare și denaturarea fibrililor.

Colagenul, așa cum se știe, conține resturi de aminoacizi acizi și bazici, iar în soluție apoasă posedă electroneutralitate, la un pH corespunzător punctului său izoelectric. De aceea, intensitatea sa de reacție este dată de indicele potențialului electrostatic superficial, iar reactivitatea și puterea de fixare sunt fundamental influențate chiar de pH-ul soluției, pH-ul reprezentând parametrul fundamental.

Zonele amorfe ale colagenului, grație mării permeabilități pentru soluții și a disponibilității și accesibilității grupelor polare, sunt în mare parte responsabile de reactivitatea colagenului (Fig.12.49.).

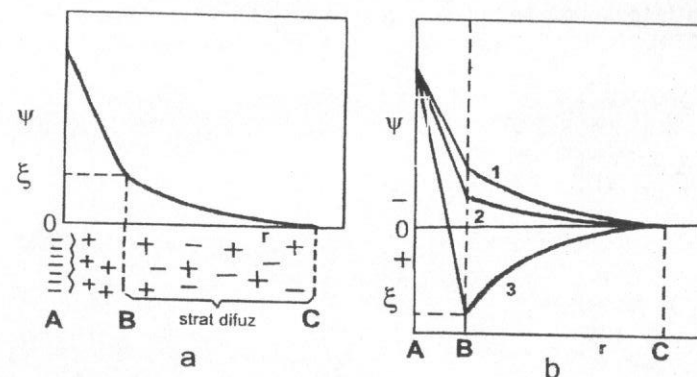


Fig.12.49. Variația potențialului electric ψ a unui coloid în funcție de distanța r de la suprafață sau descreșterea rapidă și liniară din *stratul rigid* (ioni puternic adsorbiți) și exponențială pornind de la *stratul difuz* (atmosfera ionică a cărei ioni sunt liberi, în mișcare prin agitație termică).

În figura 12.49. se indică grosimea stratului limită adsorbit și potențialul ξ sau potențialul coloidului la limita de separare între cele două straturi.

a. reprezentarea schematică a distribuției ionice în jurul unei fibre supusă încărcării negative;

b. efectul adăugării de electroliți asupra desfășurării potențialului electric.

Este necesar a se face precizarea că reactivitatea colagenului nu se datorește numai zonelor sale amorfe sau polare, deoarece, ca în toate fenomenele de chemosorbție, interacțiunile dintre adsorbant și adsorbit cuprind în faze succesive și interacțiuni cu rază scurtă (forțele van der Waals).

Fenomenul electrochimic caracteristic tuturor proteinelor este umflarea osmotică în soluție acidă sau alcalină, care produce relaxarea țesutului colagenic în zonele sale amorfe, crescându-i reactivitatea.

Umflarea poate fi socotită ca un stadiu intermediar solubilizării colagenului, în limita considerată ca o soluție foarte concentrată cu micelii din zonele cristaline și cu gel intens hidratat din zonele amorfe.

Conceptele de potențial electrostatic și potențial zeta (prezența contraionilor, stratul dublu etc.) sunt aplicabile la toate suprafețele limită solid-lichid, la a căror suprafață de separare se formează un strat dublu.

În cazul colagenului, dată fiind natura ionizabilă a suprafețelor, semnul și entitatea *potențialului Zeta* sunt determinate direct de constantele de ionizare a grupelor acide și bazice.

Pielea gelatină are $\text{pH} = 5,5$ și $\xi = -31 \text{ mV}$, după tăbăcirea în crom $\text{pH} = 6,7$ și $\xi = +25 \text{ mV}$, după tăbăcirea vegetală $\text{pH} = 4,0$ și $\xi = -85 \text{ mV}$.

Prezența electroliților în soluție, care pot să fie eventual adsorbiți de polielectrolit (stratul rigid) poate duce la comprimarea stratului dublu și căderea potențialului Zeta (curbele 1 și 2 Fig.12.49, b).

Electroliții adăugați nu alterează potențialele stratului dublu la extreme în A și C (Fig.12.49, b), ci numai valoarea lui Zeta (exact potențialul corespunzător limitei B de separație între cele două straturi).

Ionii care au sarcină opusă celei superficiale a coloidului (exemplu, ionii pozitivi în cazul Fig.12.49.a) au tendință preferențială de a pătrunde în stratul rigid și pot să inverseze semnul potențialului Zeta (curba 3 din Fig.12.49.a).

12.4.11. TRANSFORMĂRILE TERMICE ALE COLAGENULUI

Influența temperaturii asupra colagenului se manifestă, la o anumită valoare, prin fenomenul de contracție.

Temperatura la care are loc contracția se numește *temperatură de contracție* (T_s) și este specifică diferitelor colagene.

La contracția colagenului, forțele moleculare devin mai mari ca forțele intermoleculare. Contracția nu are loc brusc, la o temperatură determinată, ci este un proces lent, care progresează în timp, odată cu ruperea legăturilor intermoleculare.

Dacă, de exemplu, o probă de *piele gelatină* (este un țesut colagenic obținut prin tratarea alcalină a pielii brute pentru îndepărtarea epidermului și a substanțelor interfibrilare, iar pe cale mecanică se îndepărtează hipodermul) se încălzește în mediu apos, se constată că la temperatura de $58-65^\circ \text{C}$ începe să se deformeze, scurtându-se cam cu o treime din lungimea sa, iar volumul crește.

Se produce fenomenul de *contracție*.

Colagenul capătă vâscozitatea și elasticitatea asemănătoare cu a cauciucului vulcanizat. Scade stabilitatea caracteristică a colagenului nativ la acțiunea tripsinei, în timp ce conținutul în apă, structura observată cu ajutorul razelor X, legarea acizilor, rămân neschimbate.

Elasticitatea cauciucului este determinată de faptul că intensitatea acțiunii reciproce dintre catenele lui moleculare este foarte mică. Moleculele din corpuri solide care nu sunt caracterizate cu o mare elasticitate, vibrează numai în urma mișcării termice. În cauciuc și în alte corpuri foarte elastice, mișcarea termică se manifestă printr-o modificare continuă a formei catenelor din moleculele elastice din care sunt compuse. În urma variațiilor haotice, forma catenei, în cele mai multe cazuri, va fi strâmbă.

Creșterea elasticității colagenului în urma contracției se datorește faptului că o mare parte din legăturile prin care moleculele sale își păstrau orientarea comună înainte de contracție, s-au distrus. După ruperea acestor legături, catenele moleculare capătă formă sinuoasă [92, 161].

Creșterea elasticității colagenului în urma contracției arată că a avut loc pierderea orientării inițiale a catenelor moleculare, ele trecând în forma cea mai probabilă din punct de vedere termodinamic, sub formă de ghem. Colagenul trece atunci din forma sa semicristalină în formă amorfă.

Există o analogie între contracția colagenului și topirea substanțelor cristaline. Dacă temperatura corpului cristalin se ridică treptat, forțele molecular-cinetice duc în cele din urmă la ruperea rețelei cristaline și are loc topirea.

Colagenul se distruge la temperaturi ridicate, el nu se topește înainte de a se degrada. Temperatura de topire pe care ar trebui să o aibă colagenul deshidratat, se poate aprecia după temperatura de topire a aminoacizilor, care sunt cristalini, precum și a materialelor fibroase sintetice de tipul poliamidelor.

Legarea catenelor moleculare la formarea fibrelor poliamidice se realizează prin intermediul legăturilor de hidrogen, între grupele amidice. La topirea fibrelor polamidice legăturile de hidrogen se rup.

Ruperea legăturilor dintre moleculele unui corp solid se poate realiza prin dizolvarea sa sau prin topire.

Ruperea legăturilor intermoleculare, prin dizolvare, este întotdeauna determinată de faptul că, afinitatea moleculelor din corpul solid, față de solvent, depășește atracția lor reciprocă. Ruperea legăturilor intermoleculare prin topire se produce sub influența intensificării forțelor molecular-cinetice la creșterea temperaturii corpului.

Temperatura de topire depinde de faptul că dacă corpul supus topirii se compune din molecule de același fel sau dacă înainte de cristalizare a fost dizolvată în mediul lor o substanță oarece, care reduce întotdeauna temperatura de topire a corpului.

Teoria soluțiilor arată că temperatura de topire a oricărei substanțe poate fi redusă dacă ea este întrebuițată în calitate de solvent pentru un oarecare alt compus.

Colagenul poate fi socotit ca „mediu solvent” pentru apa care pătrunde în el în procesul de umflare.

Așa după cum orice substanță dizolvată reduce temperatura de topire a dizolvantului, în cazul de față, apa fiind substanța dizolvată în colagen, ea va

reduce temperatura de topire a colagenului, topirea transformându-se în acest caz, în contracție.

Pe baza celor arătate, se deduce că, prin mărirea gradului de umflare a colagenului temperatura de contracție scade, iar prin deshidratare crește.

Deosebirea cea mai importantă între contracția colagenului și topirea corpurilor cristaline obișnuite constă în ireversibilitatea procesului de contracție.

Aceasta se poate explica prin structura complexă a colagenului. Pentru restabilirea structurii colagenului contractat, toate grupele reactive din structură trebuie să-și găsească „vecinii lor anteriori”.

Prin contracție, rezistența colagenului scade foarte mult din cauza dezorientării structurii acestuia.

Ruperea parțială a legăturilor dintre catenele colagenului, în procesul de contracție, este însoțită de o absorbție însemnată de căldură, așa cum se întâmplă și la topirea cristalelor.

Cantitatea de căldură absorbită la contracția colagenului, după diferite măsurători, este de 16,8–25 cal. La răcirea probei de colagen contractată, o parte din legăturile rupte se reconstituie, cu care ocazie se degajă 12–13 cal., deci, o cantitate mai mică de căldură decât cea absorbită la contracție.

Contracția colagenului din tendoane. Curbele tipice lungime- C_s (concentrația soluțiilor de săruri) la temperatură constantă, lungime-temperatură la C_s constantă și lungime-temperatură la pH constant sunt date în figurile 12.50. și 12.51. [113].

Punctul central al transformării este considerat ca fiind temperatura de contracție (T_c) sau pH-ul critic sau concentrația critică a sării (C_s) pentru contracția izotermă.

Tranziția de la tendonul cristalin la tendonul amorf, în general, este mai curând bruscă și deosebit de întinsă numai la pH = 2, în absența sării, când apar forțe osmotice mari care țin să se opună contracției.

Dacă se elimină cauza contracției, lungimea fibrei de colagen are tendința să revină la mărimea inițială, dar niciodată nu-și revine complet.

Contracția este o tranziție de fază în care sunt implicate o fază cristalină și una amorfă evidențiate cu ajutorul măsurătorilor difracției cu raze X, a bire-

fringentei și a elasticității.

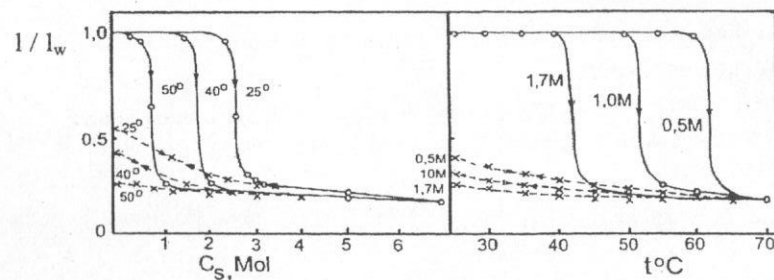


Fig. 12.50. Curbele lungime-concentrație și lungime-temperatură pentru colagenul din tendoane la molaritățile de KSCN indicate.

$f = 0$; $1/l_w$ = lungimea inițială / lungimea finală; C_s = concentrația soluțiilor [113].

Rolul pH-ului la contracția colagenului. Variația temperaturii de contracție (T_s) în funcție de pH este ilustrată în figura 12.51.

Aceste date s-au obținut din curbele lungime-temperatură, la pH constant, raportate în fig. 12.50.

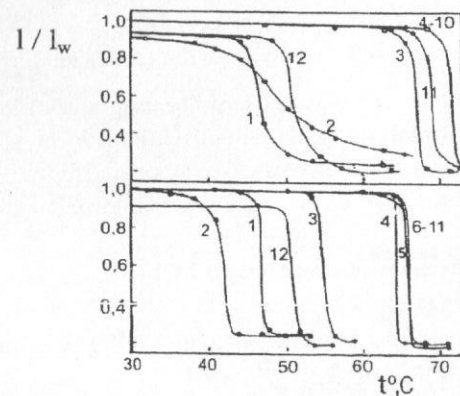


Fig. 12.51. Curbele lungime-temperatură pentru colagenul din tendoane la pH-ul indicat [113].

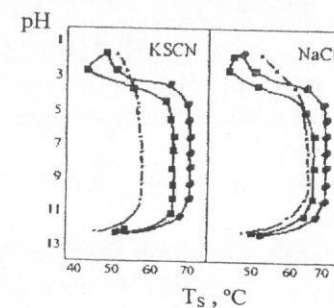


Fig. 12.52. Variația temperaturii de contracție a colagenului din tendoane, în funcție de pH. 0 - apă pură; • - 0,1 M KSCN sau NaCl; x - 0,5 M KSCN sau NaCl [113].

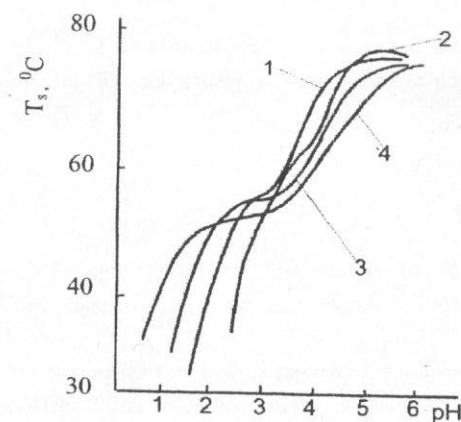


Fig. 12.53. Influența acidității asupra temperaturii de contracție a colagenului.
1. acid lactic; 2. acid acetic; 3. acid formic;
4. acid clorhidric.

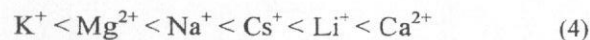
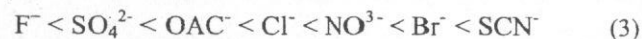
Din figura 12.52. rezultă că acidul acetic reduce foarte mult temperatura de contracție, ca și ceilalți acizi. În acest caz, rolul principal nu îl joacă ionii acidului, ci moleculele nedisociate sub a căror influență se distrug legăturile intermoleculare de hidrogen.

În figura 12.53. este reprezentată variația temperaturii de contracție în funcție de pH-ul rezultat cu diverși acizi.

Constanta de ionizare a acidului acetic este foarte apropiată de cea a grupelor carboxilice ale colagenului, încât nu împiedică ionizarea grupelor carboxilice libere. În consecință, nu distruge legăturile saline din colagen.

Rolul sărurilor la contracția colagenului. E.R. Theis și R.G.Steinhard au cercetat efectul acizilor în prezența sărurilor mono- și bivalente asupra temperaturii de contracție. Ei au dovedit că unele săruri cresc temperatura de contracție (T_s) cu mărirea concentrației lor în soluție (C_s) și altele o scad cu creșterea concentrației.

În figura 12.52., sunt prezentate curbele tipice C_s față de T_s . Peste $C_s = 1$ M toate datele admit următoarea ordine a ionilor pentru care T_s are valori descrescând:



Comparația seriilor (3) și (4) cu seriile (1) și (2) (subcap. 12.4.7.) relevă concordanța deplină a comportării sărurilor asupra colagenului la umflare și la temperatura de contracție.

De aceea, pentru o prezentare corespunzătoare a rolului pe care îl au sărurile asupra colagenului, este necesar ca influența lor asupra T_s să fie analizată în strânsă legătură cu efectul lor de umflare.

În figura 12.54. este prezentat rolul pe care îl are sarea asupra temperaturii de contracție la pH=2, când există condiții neizoelectrice maxime. Datele indică clar că rolul sărurilor este similar celui în condiții izoelectrice numai pentru concentrațiile sării $\geq 0,8$ M. Efectul tipic al polielectrolitilor manifestat la concentrația sării $\leq 0,8$ M poate fi descris ca o concepție a două efecte:

- tendință de descreștere a temperaturii de contracție care predomină la o concentrație foarte mică a sării;
- o tendință de creștere a temperaturii de contracție care predomină la concentrații mai mari ale sării.

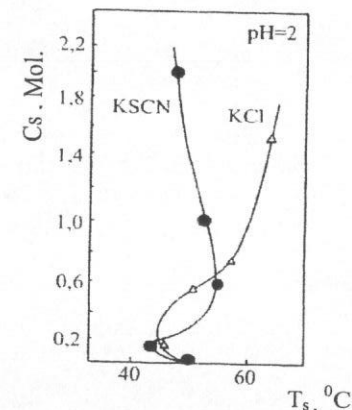


Fig. 12.54. Variația temperaturii de contracție cu concentrația la pH = 2 a colagenului din tendoane.

Primul efect este probabil asociat cu efectul sărurilor asupra valorilor aparente de pH ale grupelor ionizabile ale colagenului. Ultimul efect poate fi asociat cu o descreștere a energiei libere electrostatice a polielectrolitului, care rezultă atât din fixarea anionului, cât și din ecranizarea sarcinilor fixate de ionii mobili.

KSCN are un efect de denaturare mai mare decât KCl și T_s are valori mai mici la concentrații mai mari de sare.

Ionul SCN^- are o capacitate mai mare decât ionul Cl^- de a se fixa la grupele polare ale colagenului. Fixarea SCN^- , în astfel de condiții, poate să apară preferențial la grupele ϵ -aminice ale lizinei sau hidroxilizinei.

Efectul sărurilor neutre asupra colagenului nativ, în general, nu este permanent. O situație diferită se întâlnește în prezența unor săruri ca: $AlCl_3$ sau $KCr(SO_4)_2$ etc., care au acțiuni de reticulare cu colagenul. Spre deosebire de

săruri cum sunt NaCl, $\text{Ca}(\text{SCN})_2$, KSCN care după spălare se constată că nu au nici un efect permanent asupra tendoanelor, sărurile de crom, aluminiu, menționate mai sus, se fixează puternic de collagen.

Rolul neelecrolitilor asupra temperaturii de contracție. K.H.Gustavson a scos în evidență faptul că nu există o relație simplă între T_s și constanta dielectrică a solventului.

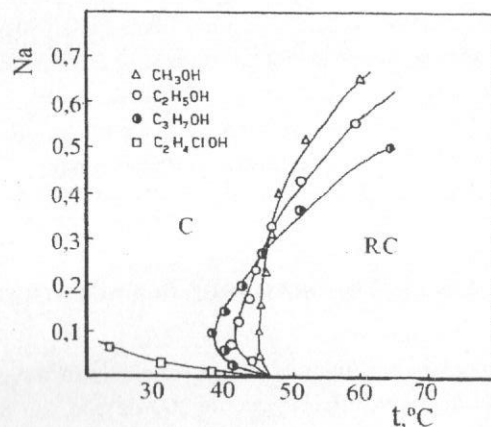


Fig. 12.55. Variația temperaturii de contracție a collagenului solubil cu concentrația soluțiilor de alcool exprimate în fracții molare a diferiților alcooli, la pH=6. Este indicat câmpul de stabilitate a fiecărei faze [133].

În figura 12.55. sunt prezentate curbele de variație a temperaturii de contracție ale collagenului în funcție de concentrația soluțiilor de alcooli alifatici simpli. Se constată că la mărirea concentrației în alcool, temperatura coboară inițial în toate cazurile studiate, ca apoi să crească odată cu creșterea conținutului de alcool în soluții.

Modificari ale collagenului la încălzirea în stare uscată. S-a arătat că topirea collagenului în stare uscată nu este posibilă, întrucât temperatura la care acesta ar trebui să se topească este ridicată și au loc degradări prealabile.

Datele din literatură arată că temperatura de contracție a collagenului deshidratat este de $140-162^\circ\text{C}$. Pe de altă parte, D.I. Virnic, D.Z. Talașev și G.N. Epstein au observat că gelatina uscată, după o încălzire la temperatura de 130°C , își pierde solubilitatea.

A.L. Zaides a arătat, de asemenea, că gelatina încălzită la temperaturi între 130°C și 170°C devine insolubilă în apă, în soluții acide și alcaline.

12.5. DENATURAREA ȘI RENATURAREA COLAGENULUI

Proteinele, în general, își păstrează activitatea biologică numai pe un interval limitat de temperatură și pH. De exemplu, expunerea proteinelor globulare la temperaturi sau pH-uri îndepărtate de temperatura sau pH-ul lor fiziologic se produce o modificare fizică numită *denaturare*, prin care, efectul cel mai vizibil este scăderea solubilității.

Obșnuit, la denaturare nu se produce ruperea legăturilor covalente și are loc pierderea activității lor biologice specifice. În unele cazuri, molecula proteică denaturată revine spontan la forma sa nativă, biologic activă, la înlăturarea efectului de denaturare, proces numit *renaturare*.

Sub influența temperaturii, a pH-ului, a unor substanțe, collagenul suferă schimbări intra- și intermoleculare, care au drept consecință modificarea structurii sale, de la o stare ordonată la una dezordonată, fără a se produce ruperea legăturilor covalente.

Termenul de denaturare include schimbarea proprietăților fizice și, în mică măsură, a celor chimice, expresie a modificărilor conformaționale ale lanțurilor polipeptidice. Are loc ruperea legăturilor de hidrogen, a forțelor van der Waals, dezordonarea lanțurilor polipeptidice ale moleculelor de collagen, care trec din forma de bastonaș rigid în forma de ghem.

Denaturarea collagenului implică tranziția lui din stadiu nativ de semicristalinitate, într-o formă amorfă cu organizare întâmplătoare.

Prin încălzire, la aproximativ 35°C , se produc modificări importante de vâscozitate și de rotație optică la soluțiile diluate de collagen, această temperatură fiind denumită *temperatură de denaturare* (T_D).

La denaturarea termică, energia termică devine mai mare decât energia le-

găturilor necovalente din molecula de colagen nativ. Moleculele de apă au un rol deosebit de important la denaturarea termică. Se consideră că, în soluție apoasă, structura multor proteine se află la limita de stabilitate, datorită capacității moleculelor de apă de a forma legături de hidrogen. La încălzire, legăturile de hidrogen din moleculele de colagen se rup și se reformează cu moleculele de apă din sistem.

Studii electrono-microscopice asupra denaturării termice a fibrelor de colagen au arătat că la temperatura de 60°C se formează segmente amorfe mai groase decât fibra nativă.

Este posibil ca denaturarea să înceapă la această temperatură, iar la 70°C, și peste această temperatură, denaturarea să fie completă.

Dacă denaturarea colagenului, sub influența temperaturii, se face în mediu apos, întotdeauna este implicat și pH-ul.

PH-ul izoelectric nu influențează procesul de denaturare. Dacă ne îndepărțăm de pH_i spre valori mai acide sau mai alcaline, denaturarea colagenului începe să se manifeste și crește cu mărirea acidității sau a alcalinității.

Denaturarea sub influența pH-ului se datorește tuturor factorilor care provoacă umflarea osmotică sau liotropă a colagenului și este într-o strânsă interdependență cu modul de desfășurare a acestor procese.

Denaturarea colagenului poate fi provocată de acizi, baze, săruri liotrope, care modifică gradul de ionizare a colagenului, solubilitatea sa, proprietățile hidrodinamice și comportarea electroforetică.

În situația în care cauzele care au produs denaturarea colagenului încetează, există tendința de *renaturare*, adică de reordonare a structurii sale, prin refacerea legăturilor care s-au rupt în timpul procesului de denaturare.

Pentru faptul că nu se produc modificări chimice la denaturare, colagenul denaturat privit la microscopul electronic are aceeași înfățișare ca și a colagenului nativ.

A. Veis și J. Cohen au studiat renaturarea colagenului sub formă de fibre native pornind de la gelatină. Au pornit de la o soluție diluată de gelatină formată, mai ales, din componente cu greutate moleculară mare, pe care au încălzit-o câteva ore, la temperatura de 40°C și apoi au ridicat temperatura până

aproape de temperatura de dezagregare a colagenului [162].

Engel și Beier au făcut renaturarea colagenului pornind de la o soluție de colagen obținută în mediu de acid acetic, colagen care în prealabil a fost denaturat. Fracțiunile de colagen renaturate, determinate prin ultracentrifugare, s-au dovedit a fi bogate în componente γ [163].

Procesul de renaturare pornește cu formarea unui nucleu, prin plierea de lanțuri polipeptidice, care apoi se dezvoltă treptat, de-a lungul lanțurilor polipeptidice, până la formarea structurii fibrelor de colagen nativ.

K. Kühn și colab. au arătat că soluțiile de gelatină bogate în componente α și β și sărace în componente γ formează prin renaturare colagen nativ, dar cu o structură mai slab organizată față de cel obținut din soluțiile de gelatină bogate în componente γ [164].

12.6. ENZIME CARE PRODUC DEGRADAREA COLAGENULUI

Colagenul, din diferitele țesuturi, *in vivo*, se reînnoiește în perioade variabile de timp. Studii cu izotopi radioactivi, făcute pe șobolani, au dovedit că timpul de înjumătățire a colagenului din piele este de 200 de zile, din mușchi de 60 de zile și din ficat de 30 de zile [3].

În unele situații, colagenul se degradează și se reînnoiește mult mai repede (la involuția uterului după naștere, la vindecarea rănilor etc.). Indiferent de timpul de reînnoire, în procesele fiziologice normale există un *echilibru între biosinteza colagenului și degradarea sa*. Această degradare se numește *colagenoliză* și are loc sub acțiunea unor enzime hidrolitice numite collagenaze.

La hidroliza produsă asupra colagenului de către collagenaze rezultă polipeptide, peptide, aminoacizi, printre care și hidroxiprolină, care nu este reutilizată la biosinteza colagenului și o parte din aceasta este eliminată prin urină.

Dozarea hidroxiprolinei din plasmă sau urină servește la diagnosticarea unor stări patologice care sunt însoțite de colagenolize.

12.6.1. COLAGENAZE ANIMALE

În unele țesuturi sau organe s-a identificat, alături de alte enzime și o collagenază, enzimă capabilă de a degrada colagenul nativ.

În sucul pancreatic se găsește o cantitate foarte mică de colagenază; ea este inhibată de diizopropilfosforhidrat și de cisteină. În centrul său activ există un rest de serină.

Colagenazele de țesut sunt metalo-enzime și sunt inhibate de cisteină, care leagă chelatic metalul.

A.Z. Eisen a arătat că în extractele de hepato-pancreas de la crab există o enzimă cu proprietăți intermediare între cele ale colagenazelor de țesut (metaloenzyme) și a celor din pancreas (serino-proteaze).

Din coada de mormoloc de broască a fost izolată o enzimă caracterizată drept colagenază. Această enzimă rupe legătura peptidică dintre leucină sau izoleucină și glicină, fiind inhibată de prezența Ca^{2+} și a altor ioni bivalenți ca și de radicalul $-\text{SH}$. Scindează molecula nativă de collagen în două părți inegale și anume, 1/4 și 3/4 din lungimea unui lanț polipeptidic.

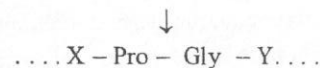
12.6.2. COLAGENAZE BACTERIENE

Clostridiopeptidaza A sau *colagenaza* este o enzimă izolată din diferite tulpini ale reprezentanților familiei Bacillaceae, genul *Clostridium* (*Cl. Histoliticum*, *Cl. Perfringens tip A*), cu funcție catalitică asupra collagenului nativ și denaturat, la valori de temperatură și pH fiziologice [90, 163] (vezi cap.11, Vol.II, Enzime).

După cum se știe, collagenul este o proteină specifică pentru țesutul conjunctiv și conține cantități mari de glicină, prolină și hidroxiprolină. În același timp, colagenaza nu hidrolizează proteinele globulare și nici pe cele fibroase în afară de collagenul nativ și cel denaturat.

Aceasta arată specificitatea restrânsă de acțiune a colagenazei, care se limitează la collagenul nativ și la cel denaturat.

Colagenaza hidrolizează legătura peptidică dintre prolină sau hidroxiprolină și glicină, adică:



în care, X și Y sunt resturi de diferiți aminoacizi.

Dacă resturile de prolină sau hidroxiprolină sunt substituite de resturi de sarcozină ($\text{CH}_3\text{NHCH}_2-\text{COOH}$), viteza reacției de hidroliză este mult diminuată; aceeași situație se prezintă și în cazul în care resturile de glicină sunt substituite cu resturi de alanină sau dacă în poziția Y se găsesc resturi de Arg sau Glu.

Colagenaza provenită de la *Clostridium histoliticum* poate să cliveze un lanț polipeptidic în mai mult de 200 de puncte.

Toate celelalte enzime proteolitice nu au acțiune hidrolitică asupra collagenului nativ; ele pot cataliza hidroliza legăturilor peptidice numai ale collagenului denaturat.

Se remarcă doar câteva aspecte ale acțiunii unor enzime proteolitice, care nu sunt colagenaze, asupra collagenului nativ.

Astfel, la tratarea cu tripsină sau cu pepsină a unei soluții de collagen, s-a observat scăderea vâscozității, presupunându-se că ar fi datorită degradării altor proteine care ar impurifica collagenul, cu toate că posibilitățile de agregare ale collagenului au fost identice cu cele căpătate după purificare prin precipitări repetate [162, 163, 164].

Peptidele obținute prin acțiunea proteolitică a enzimelor sunt fragmente ne-helicoidale din telopeptidele de la capetele moleculei de collagen [162].

P. Bornstein și colab. și G.R.Martin și colab. [58] au constatat că după tratamentul cu pepsină se reduce conținutul în componenți γ și β și crește cantitatea de lanțuri α în molecula de collagen. Același fapt s-a observat și la acțiunea chimotripsinei [162, 166, 167, 168].

12.7. HIDROLIZA COLAGENULUI

Supunând collagenul, în mediu apos, la temperaturi ridicate, cu sau fără adaos de acizi, baze sau săruri liotrope, are loc un proces de hidroliză.

Hidrolizatele de collagen se obțin din țesuturi conjunctive bogate în collagen, cum ar fi dermul, tendoanele, cartilajele etc.

Hidroliza chimică a collagenului este influențată de următorii factori: natura agentului care catalizează reacția, concentrația sa, temperatura și durata de

tratament. În funcție de condițiile de hidroliză se cunosc trei categorii de hidrolizate obținute prin hidroliză neutră, acidă și alcalină.

Hidroliza neutră duce la hidrolizate cu masă moleculară mare.

Hidroliza acidă, în aceleași condiții de durată și temperatură, se produce cu mai mare intensitate decât hidroliza alcalină, în sensul că hidrolizatele, la aceeași concentrație, au o vâscozitate și masă moleculară medie mai mici. În schimb, se produc mai puține modificări la nivelul aminoacizilor.

Hidroliza acidă se efectuează, de obicei, cu acid clorhidric, iar cea alcalină cu hidroxid de sodiu.

Pentru a se estima variația randamentelor de hidroliză în funcție de parametrii de lucru (temperatură, durată, pH), s-au făcut experimentări pe probe de piele gelatină, categoria 20kg bucata, de crupon de bovine, iar rezultatele sunt date în tabelele 12.21 și 12.22.

Tabelul 11.21.

Conținutul în substanță uscată a hidrolizatelor de colagen la hidroliza neutră

Durata minute	Temperatura °C				
	120	135	150	175	200
15	—	78,71	79,79	98,55	98,69
30	—	—	96,09	99,20	99,48
45	—	98,01	98,23	99,55	99,80
60	97,50	98,50	98,66	99,81	99,96
90	98,50	98,90	99,05	99,86	99,96

S-a determinat cantitatea de colagen trecută în soluție la hidrolize, exprimată în substanță uscată și raportată la substanța uscată a colagenului luat în lucru.

Se constată că odată cu creșterea temperaturii și a duratei de hidroliză se ajunge la trecerea în soluție a întregii cantități de colagen luată în lucru [169]. De asemenea, pe măsură ce pH-ul mediului este mai acid sau mai alcalin hidroliza colagenului este mai intensă și mai rapidă.

12.8. CONVERSIA COLAGENULUI ÎN GELATINĂ

Gelatina este un produs solubil în apă rezultat al dizolvării, dezorganizării și degradării fibrelor de colagen insolubile în apă.

Tabelul 11.22.

Conținutul în substanță uscată a hidrolizatelor de colagen obținute la hidroliza acidă și hidroliza alcalină

Durata minute	pH-ul									
	2	3	4	5	8	9	10	11	12	13
Temperatura de 120° C										
15	82,9	77,6	—	55,2	70,5	—	—	—	95,5	99,5
30	96,5	94,1	—	75,9	81,6	89,1	—	—	98,5	99,5
45	97,2	97,0	97,6	91,7	95,6	98,5	93,1	90,0	99,2	99,6
60	97,4	97,4	97,6	99,2	97,1	98,8	98,9	92,1	99,3	99,7
90	97,5	98,2	99,6	99,2	97,4	98,9	99,0	99,5	99,6	99,8
Temperatura de 135° C										
15	87,0	—	82,5	75,0	77,8	82,6	95,4	—	92,6	99,4
30	94,1	98,9	97,9	85,6	83,6	98,2	99,5	94,9	97,9	99,5
45	95,6	99,0	99,2	93,5	98,6	98,9	99,6	98,6	98,9	99,6
60	96,0	99,1	99,3	96,8	99,5	99,2	99,7	98,7	99,6	99,7
90	97,0	99,2	99,5	99,4	99,6	99,6	99,8	99,8	99,7	99,8

Gelatina este compusă din lanțuri mai lungi și mai scurte de aminoacizi în funcție de intensitatea degradării structurii colagenului.

În general, degradarea nu este complet întâmplătoare, iar rezultatul arată că cele mai multe gelatine nu sunt omogene cu privire la greutatea lor moleculară [103, 170].

Ward consideră că gelatina reprezintă un derivat al colagenului rezultat în urma ruperii legăturilor inter- și intramoleculare ale colagenului nativ, printr-o alegere judicioasă a factorilor fizico-chimici, astfel încât să rezulte lanțuri de tip α sub formă de ghem, care au o masă moleculară medie de circa 95000 Da și prezintă fenomenul de gelatinizare la $T < 20^{\circ}\text{C}$ [171].

Alți cercetători extind conceptul de gelatină la entități moleculare provenite din collagen, care se caracterizează printr-o masă moleculară medie de 50000–1000000 Da, prezintă o conformație tipică de ghem și dă fenomenul de gelatinizare de la $T < 10^0\text{C}$.

Acceptând ultima opinie, înseamnă că gelatina reprezintă un produs de hidroliză a collagenului ale cărei caracteristici fizico-chimice sunt total dependente de modul de conducere al procesului chimic de scindare a legăturilor chimice ce caracterizează structura collagenului nativ [136].

Grupele funcționale acide sau bazice ale aminoacizilor lanțurilor polipeptidice conferă gelatinelor caracteristici de polielectroliți.

Încărcarea electrică contribuie la o serie de interacțiuni între moleculele de gelatină și între moleculele de gelatină și solvent. Aceasta afectează vâscozitatea și multe alte proprietăți hidrodinamice.

Pentru cunoașterea și caracterizarea gelatinei trebuie a se lua în considerație sarcina netă a moleculelor de gelatină, natura grupelor ionizabile și distribuția lor internă.

Provenind din collagen, gelatina are aceeași compoziție în aminoacizi, dar mai multe grupe terminale aminice și carboxilice, ceea ce face ca proprietățile sale de poliamfolit să difere de cele ale collagenului.

Conversia collagenului în gelatină poate avea loc pornindu-se de la collagenul solubil sau de la collagenul insolubil. Collagenul solubil poate fi ușor transformat în gelatină prin utilizarea unor agenți de denaturare, fără hidroliză, în timp ce collagenul insolubil din fibrele mature trece mai greu în gelatină.

Dezordinea produsă fibrelor de collagen insolubil, supuse unei anumite temperaturi, se caracterizează prin contracția bruscă a fibrei pe direcția axei. Dezordonarea collagenului solubil, la încălzirea în soluție, se manifestă prin descreșterea vâscozității și prin modificări ale levorotației specifice [162, 172].

Cu toate că asupra collagenului solubil, s-au întreprins numeroase studii privind gelatina, acesta reprezintă o fracțiune mică din collagenul țesuturilor.

O cantitate mult mai mare de gelatină se extrage din collagenul insolubil cu ajutorul agenților de denaturare.

Denaturarea termică, urmată de o extracție la temperatură ridicată, are ca efect solubilizarea collagenului sub formă de gelatină. În funcție de intensitatea procesului are loc degradarea care implică și reacții de hidroliză.

Gelatina poate fi definită ca produsul acvasolubil provenit din dizolvarea, dezorganizarea și degradarea fibrelor de collagen nativ.

Astfel, gelatinizarea necesită procese de dezagregare structurală, de hidroliză a unor legături peptidice și transversale și de dispersie a lanțurilor peptidice rezultate.

În scopul obținerii gelatinei, se pot distinge două clase de colagene:

- collagenul din țesuturile „moi” (piele, tendon etc.)
- collagenul din țesuturile „tari” (oase, dentină).

În țesuturile moi structura fibrelor collagenice permite pătrunderea, cu ușurință, a reactivilor și a apei.

Veis și colab. au fracționat, prin ultracentrifugare, o gelatină cu greutate moleculară mare și au constatat că elementele sale componente sunt echivalente, din punct de vedere al greutății moleculare și al coeficienților de sedimentare, cu lanțurile polipeptidice α și β ale tropocolagenului.

Fracțiunea de gelatină bogată în constituenți asemănători cu componentele γ poate fi renaturată sub forma unei structuri de fibre de collagen nativ. La renaturarea unui amestec de componente α și γ are loc transformarea componentelor γ în fibre de collagen nativ, iar componentele α rămân în soluție.

Collagenul din oase și dentină poate fi extras sub formă de gelatină într-o cantitate mică. O caracteristică a collagenului din țesuturile tari o constituie prezența legăturilor covalente cu fosfat.

Procedee de obținere a gelatinei. Obținerea gelatinei se poate realiza printr-o mare varietate de procedee, care se pot clasifica după mai multe criterii, dintre care:

- resursa de collagen;
- actorii implicați în proces (temperatură, pH-ul de pretratare, timpul de extracție, numărul de extracții etc.);
- forma de collagen (solubil, insolubil).

Sursa de materii prime pentru producția de gelatină este destul de variată (tabelul 12.23), iar calitatea gelatinei depinde de specie, rasă, vârsta animalelor, precum și de condițiile de depozitare ale materiei prime.

Tabelul 12.23.

Compoziția materiei prime și randamentul în gelatină [136, 171]

Materia primă	Randamentul în gelatină uscată %	Compoziția materiei prime		
		Substanțe grase, %	Apă %	Reziduu %
Piei de bovine sărate	7 – 16	2	30 – 40	9
uscate	35 – 52	1	10	5
Piei de bivol uscate	45 – 50	1	10 – 20	10
Os cu tendon uscat	35 – 40	—	10 – 15	30
Tendon uscat	50 – 70	—	15	—
Piei de porcine congelate	18 – 22	7 – 25	55 – 65	8 – 15

Gelatina se obține din colagenul solubil, când are loc *tranziția helix-ghem* și din colagen insolubil utilizând *procedee de extracție directe* sau *indirecte*.

În procedeele care utilizează colagenul solubil, are loc ruperea ansamblului de legături care stabilizează triplul helix al colagenului, când are loc tranziția de la starea ordonată la cea dezordonată, adică se produce tranziția helix – ghem.

Această tranziție poate avea loc cu ajutorul unor *agenți liotropi* sau pe cale termică.

Agenții liotropi ca: uree, KCNS, CaCl₂, fenol, CH₃COOH etc., adăugați soluțiilor de colagen, rup legăturile de hidrogen inter- și intramoleculare și se leagă de lanțurile colagenice dezorientate prin forțe van der Waals.

Procedeele de obținere a gelatinei din colagenul solubil pe cale termică constau în menținerea soluțiilor de colagen la concentrația, pH-ul și tăria ionică dorite, la o temperatură și durată stabilite. Evidențierea tranziției helix-ghem se realizează prin compararea mai multor proprietăți ale colagenului dizolvat în-

te și după acțiunea agenților liotropi sau a temperaturii. Frecvent, se folosește determinarea vâscozității.

La obținerea gelatinei din soluțiile de colagen prin tranziția helix-ghem se desprind următoarele concluzii:

a. Temperatura, concentrația agentului și timpul sunt factori interdependenți care își manifestă efectul prin caracteristicile gelatinei și anume: masa moleculară medie, temperatura de gelatinizare, proprietățile fizico-chimice și mecanice ale gelului (modulul de elasticitate, rezistența la tracțiune, indicii de refracție etc.). Temperatura de gelatinizare (temperatura la care se produce tranziția helix-ghem) este asociată cu viteza de gelatinizare (intervalul de timp în care are loc tranziția helix-ghem).

b. Dacă materialul colagenic conține un procent mai ridicat de fracțiuni β și γ , temperatura de transformare în helix-ghem va fi mai mare.

c. Temperatura, cu sau fără participarea agenților liotropi, influențează principalele caracteristici ale gelatinei. Astfel, s-a constatat că până la temperatura de 35–40°C nu se produc modificări de masă moleculară, temperaturile de gelatinizare se vor situa între 25–35°C, iar indicii de refracție va depăși valoarea de 1,5. În intervalul de 40–60°C, apar ruperi de legături covalente intermoleculare care deplasează temperatura de gelatinizare sub 25°C, iar indicii de refracție este sub 1,45. Peste 60°C, apar ruperi de legături peptidice, temperatura de gelatinizare scade sub 20°C, iar indicii de refracție scade sub 1,4.

Obținerea gelatinei prin procedeele de extracție se poate realiza folosind *procedee directe* sau fără pretratament și *procedee indirecte* sau cu pretratament.

În procedeele de extracție directe, materia primă se tratează cu apă sau soluții apoase de acizi, baze sau săruri, prin încălzire la o anumită temperatură și o anumită durată.

Extracția gelatinei depinde esențial de pH, temperatură și durată, precum și de prezența unor activatori de solubilizare (agenți liotropi). La temperatura de 60°C și durata de 4 ore, de exemplu, cantitatea de gelatină obținută crește de la 15% la pH=5,75 la peste 70% la pH=2.

Analiza corelației dintre pH și durata de extracție arată că la temperaturi cuprinse între 50⁰ și 70⁰C, când gradul de distrucție a legăturilor peptidice este minim, extracția are loc selectiv.

La pH apropiat de pH_i, se extrag formațiuni de colagen foarte apropiate de structura colagenului solubilizat. La valori din ce în ce mai îndepărtate de pH_i, randamentul de solubilizare crește, dar și alterarea structurii colagenului se intensifică.

Scurtând durata de extracție și repetând procesul la pH-uri diferite, se ajunge la așa numita *extracție multiplă* sau *succesivă*, când s-a remarcat o uniformizare a structurii gelatinei rezultate.

Creșterea temperaturii de extracție favorizează mărirea randamentului de extracție. Adaosul de agenți liotropi crește proporția de gelatină extrasă de 1,2–2,0 ori.

Procedeele de extracție directă a gelatinei nu prezintă interes industrial din cauza randamentelor mici, cu circa 5–15%, față de procedeele indirecte.

Procedeele de extracție indirectă a gelatinei sunt prevăzute cu pretratamente (acide, alcaline, enzimatic), care au rolul de a produce ruperea unor punți de reticulare din colagen, producându-se astfel creșterea randamentului de extracție a gelatinei.

Pretratatamentul acid (HCl, H₂SO₄, H₃PO₄ etc.) este indicat pentru materialele mai puțin reticulate (piei de porcine, piei de iepuri), durata de tratament este mică (10–48 ore) și apa reziduală mai redusă.

Pretratatamentul alcalin dă, la extracție, randamente superioare în gelatină, iar gelatina obținută are proprietăți și puritate superioare altor gelatine.

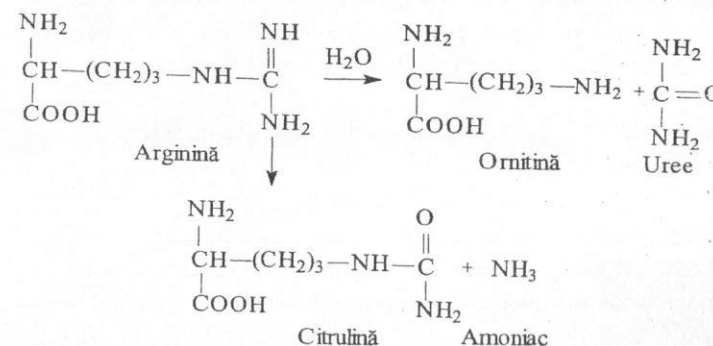
Pretratatamentul alcalin urmărește distrugerea punților de reticulare prezente în colagen și îndepărtarea altor substanțe necolagenice.

Pretratatamentul alcalin, cu o suspensie de hidroxid de calciu, produce modificări structurale, care pot fi evidențiate prin scăderea pH_i datorită conversiei grupelor amidice de la asparagină și glutamină la grupe carboxilice, cu punere în libertate de amoniac.

Deamidarea nu este implicată, însă, în conversia colagenului în gelatină, dar un tratament alcalin prelungit duce la pierderi de colagen în soluția de tra-

tare și un randament mai scăzut în gelatină.

La durate lungi de tratament alcalin, se pot rupe legături peptidice și se poate produce uree ca urmare a deguanidizării argininei, conform reacției:



Pentru scurtarea duratei de tratament și creșterea randamentului în gelatină, se recomandă adăugarea de agenți liotropi [173].

Extracția gelatinei este controlată prin intermediul a patru factori de bază: temperatura, durata, pH-ul și numărul de extracții.

Cu cât pH-ul de extracție, la aceeași temperatură, este mai depărtat de pH_i al materialului, cu atât durata de extracție este mai mică, randamentul crește, masa moleculară medie scade și timpul de gelatinizare scade. Dacă se menține pH-ul departe de pH_i și se scade temperatura, durata de extracție crește, numărul de extracții necesare crește, însă crește masa moleculară medie a gelatinei, de asemenea, cresc viteza și temperatura de gelatinizare.

Cel mai folosit procedeu industrial de producere a gelatinei, realizează extracția la pH constant, iar durata de extracție este ușor crescătoare în fiecare etapă cu 20–40 min și temperatura crește începând de la 50–60⁰C cu câte 5⁰–10⁰C în fiecare etapă până la temperatura de fierbere.

Randamentele de extracție se situează la 80–90% pentru un număr mediu de 6–8 extracții.

Proprietățile gelatinei variază în raport cu fiecare extracție, valorile maxime ale proprietăților corespund zonei de mijloc a numărului de extracții.

Soluțiile de gelatină obținute se supun decolorării (albirii) cu reducători (SO_2 , sulfiți) și cu oxidanți, de regulă apa oxigenată.

Pentru scopuri alimentare, se folosește numai decolorarea cu apă oxigenată. Soluțiile de gelatină se supun apoi filtrării și clarificării. Clarificarea se poate face pe cale chimică, cu fosfat de calciu, cu oxid de calciu și sulfat de aluminiu.

Clarificarea se face frecvent pe cale mecanică, prin sedimentarea liberă a fazei insolubile.

Soluțiile de gelatină clarificate se concentrează și se usucă.

Evaporarea apei dintr-o soluție de gelatină trebuie să țină cont de termosenibilitatea accentuată a soluției, respectiv posibilitatea de alterare a structurii chimice a proteinei. De aceea, procesul se realizează astfel încât temperatura să nu depășească 80°C și timpul de contact cu suprafețele calde să fie cât mai scurt.

Majoritatea tehnologiilor fac apel la instalațiile care funcționează sub vid.

Înainte de uscare, soluțiile concentrate se sterilizează, pentru a se distruge agenții patogeni, printr-o încălzire a soluției la temperatura de $120^\circ\text{--}140^\circ\text{C}$, timp de 40–60 sec., condiții în care nu se alterează structura chimică a proteinei.

Ultima operație de producere a gelatinei este uscarea soluției concentrate.

Un procedeu folosit este răcirea soluției concentrate în vederea gelifierii și apoi gelul se usucă. Se utilizează și alte procedee ca: atomizarea soluției sau uscarea pe tambur.

Produsul finit se prezintă sub formă de pulbere, granule neuniforme ca mărime sau folii.

12.9. MODIFICĂRI CHIMICE ALE COLAGENULUI

Pentru utilizarea colagenului în anumite scopuri, sunt necesare modificări chimice ca: *transformări polimer analoage*, când sunt implicate grupele funcționale ale resturilor de aminoacizi, *grefări*, prin legarea de molecula de colagen a unor structuri de tip oligomer și *reticulări* care au rolul formării unor noi configurații tridimensionale [136].

Transformări polimer-analoage constau în tratarea colagenului cu compuși micromoleculari capabili să reacționeze cu grupele funcționale ale resturilor laterale ale aminoacizilor din lanțurile polipeptidice [174, 175, 176].

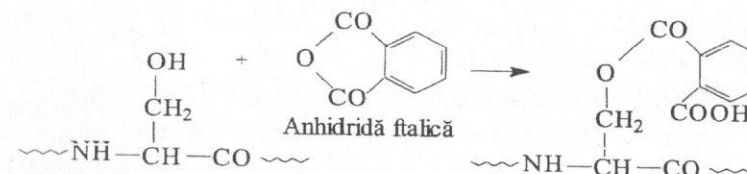
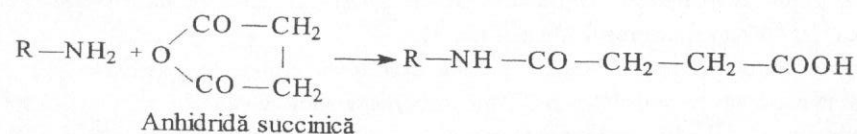
Modificările chimice ale grupelor aminice și hidroxilice se poate face cu cloruri acide, anhidride, derivați halogenați, epoxizi, izocianați, compuși cu duble legături [177, 178, 179].

Reacțiile *clorurilor acide* cu grupele aminice ale colagenului duc la deplasarea pH_i , prin diminuarea caracterului hidrofil. Dintre reactivii cei mai utilizați sunt: clorura de benzoil, cloruri ale acizilor grași, sulfocloruri cu resturi alifaticе sau aromatice.



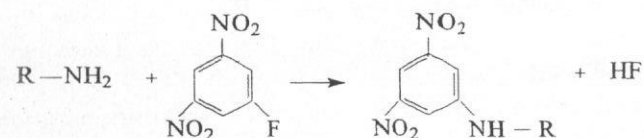
Dintre *anhidride* se menționează: anhidrida ftalică, anhidrida succinică și anhidrida maleică, care reacționează cu ușurință cu grupele aminice și hidroxilice ale colagenului.

Reacțiile dintre colagen și clorurile acide sau anhidride sunt dependente de pH [180, 181, 182].



Se menționează, de asemenea, reacțiile de transformare a colagenului cu clorurile cu duble legături cum sunt clorura de acrilil și metaacrilil, care fac colagenul reactiv în procesele chimice cu mecanisme radicalice [183, 184].

Derivații halogenați, cei mai cunoscuți, care produc transformări chimice asupra colagenului, fac parte din clasa halogenurilor aril: clorura și bromura de benzil, diclorodifenil metanul, dinitrofluorbenzenul etc.

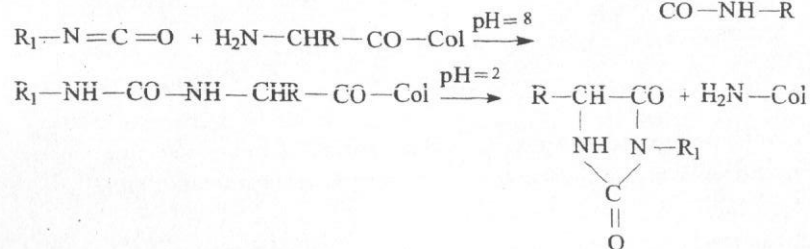
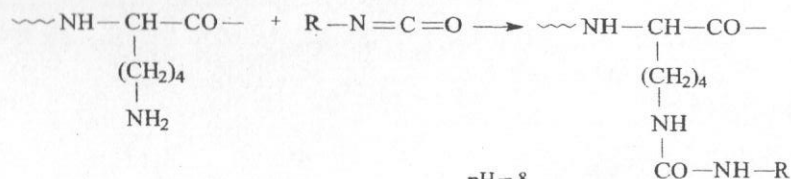


Epoxizii reacționează cu grupele bazice ca și cu grupele carboxilice ale colagenului:



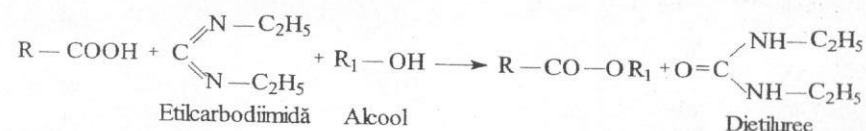
Dintre epoxizi au fost intens folosite epiclorhidrina și esterii de glicidil pe colagen și gelatină [185].

Izocianatii reacționează cu colagenul astfel :



Pe baza experimentelor cu diferiți izocianați s-a constatat că derivații de tip uretan s-au dovedit că posedă proprietăți asemănătoare compușilor obținuți cu cloruri ale acizilor arilsulfonici [186, 187].

Modificările chimice ale grupelor carboxilice se realizează prin metodele generale cunoscute [174, 188]. Cei mai folosiți reactivi pentru grupa carboxilică sunt carbodiimidele sub formă solubilă și insolubilă în apă.



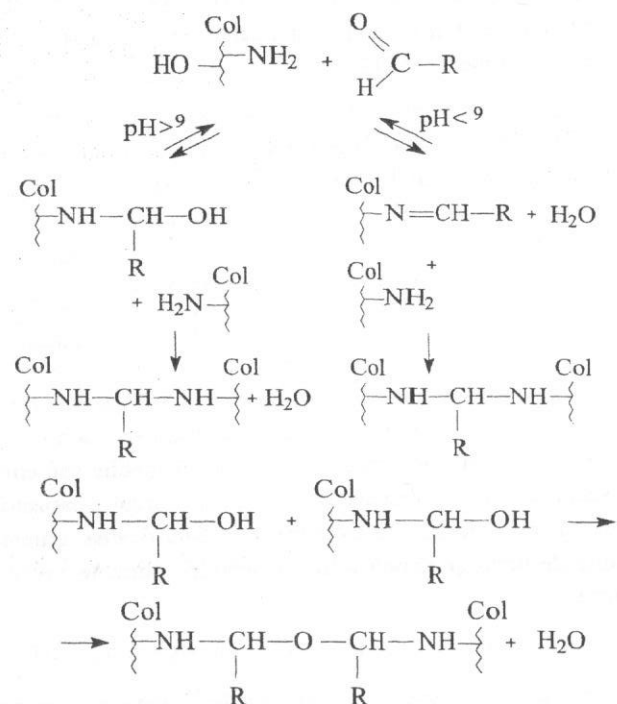
Esterificările cu carbodiimide sunt folosite atât pentru blocare, cât și pentru a conferi o stare de reactivitate accentuată grupelor carboxilice. Esterificările cu carbodiimide sunt preferate celor cu alcool metilic sau etilic, care realizate în absența apei și în prezența unor acizi tari, drept catalizatori, sunt însoțite de reacții de hidroliză a colagenului. Esterificarea grupelor carboxilice cu clorură de tionil și alcoolii alifatici anhidri elimină formarea apei ca produs secundar.



Modificări chimice ale colagenului prin reacții de grefare au loc prin tratarea cu monomeri polimerizabili și provocarea reacției în condițiile specifice polimerilor sintetici (inițiere cu inițiatori termici, redox sau cu surse de energie). Principalele clase de monomeri utilizați la grefarea colagenului sunt: monomerii vinilici, monomerii acrilici, anhidridele alifactice, N-carboxianhidridele, lactamele, lactonele.

Reticularea colagenului urmărește transformarea structurilor liniare și ramificate în structuri tridimensionale și se realizează pe cale chimică, enzimatică și fizică.

Principalele reacții ale colagenului cu aldehida formică sunt următoarele:



Reticularea chimică se realizează printr-un număr mare de combinații, la care au loc diverse mecanisme de reacție și tipuri de legături (covalente, coordinative, ionice, de hidrogen), la care participă diferitele grupări funcționale ale colagenului.

Formarea legăturilor covalente poate avea loc cu agenți de reticulare, atât prin mecanisme non-radicalice, cât și prin mecanisme radicalice.

Din rândul agenților de reticulare ai colagenului cu mecanism non-radicalic, se prezintă date despre aldehide (aldehida formică, aldehida glutarică), polieteroxizii proveniți de la glicerină (glicerol diglicidil eter), poliizocianati (hexameten diizocianatul), agenți de cuplare neîncatenabili (carbodiimidele).

Mecanismul de reacție nu este complet elucidat [189, 190, 191, 192, 193].

Se admite că aldehida formică generează în proporții aproximativ egale atât grupări metilolice cât și baze Schiff [136].

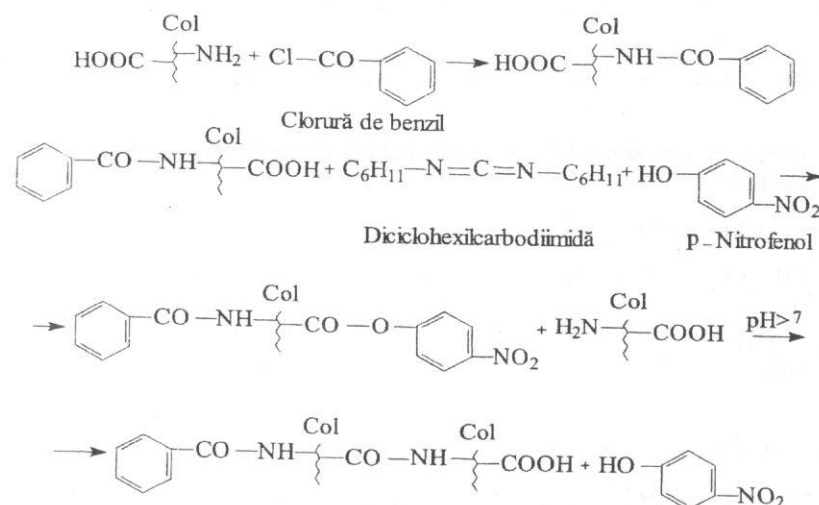
Creșterea pH-ului, care mărește caracterul electrofil al grupărilor bazice, îmbogățește conținutul în funcții metilolice.

În mediu neutru, predomină bazele Schiff.

pH-ul are un rol deosebit de important privind fixarea și stabilitatea legăturii între colagen și aldehidă.

Colagenului i se pot bloca grupele bazice sau acide și activa grupele acide sau bazice, iar, în final, *colagenul modificat* poate reacționa cu colagenul nemodificat.

Se exemplifică chimismul bazat pe activarea grupelor carboxilice:



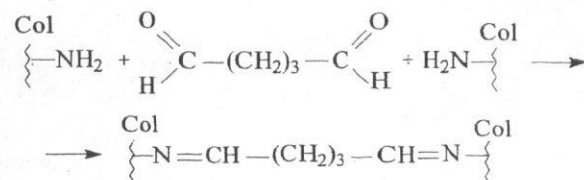
Metoda de reticulare prezentată mai sus a fost utilizată la hidrolizatele de colagen pentru obținerea poliaminoacizilor cu aplicații la realizarea unor biomateriale [194 – 196].

Pentru reticularea colagenului s-au experimentat agenți de reticulare poli-funcționali, care sunt combinații organice cu două sau mai multe grupe reac-

tive. Cei mai folosiți agenți de reticulare polifuncționali sunt: aldehida glutarică, derivați epoxidici ai glicerinei și poliizocianați.

Aldehida glutarică este un agent de reticulare ce s-a folosit la reticularea colagenului nativ solubil, a eucolagenului și a gelatinei [197–200].

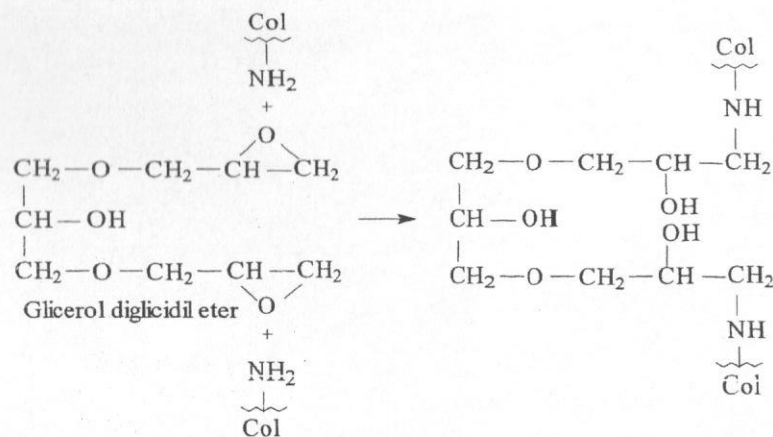
Aldehida glutarică reacționează cu grupele bazice ale colagenului, astfel:



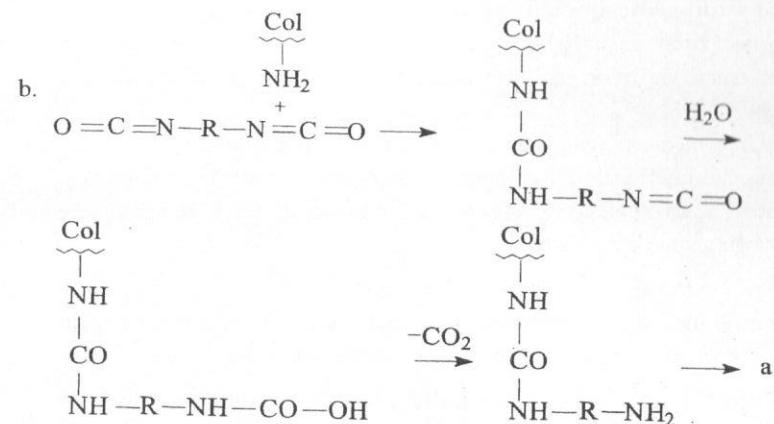
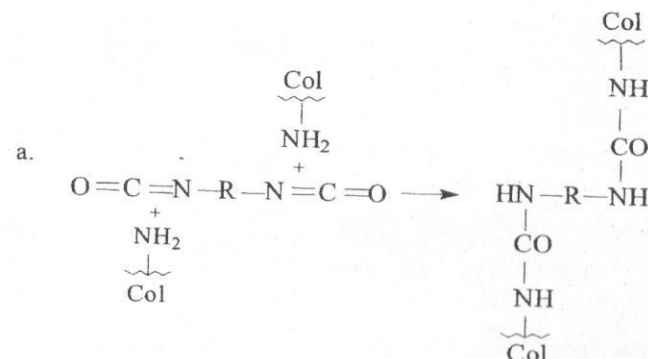
La reacția cu derivați glicidici participă resturile laterale de la lizină, arginină și histidină [201].

Dacă $\text{pH} > 8$ participă la reacție grupele carboxilice ale colagenului.

După anii 1980, polieteroxizii proveniți de la glicerină au fost mult cerțați și aplicați la reticularea colagenului și a derivaților săi:



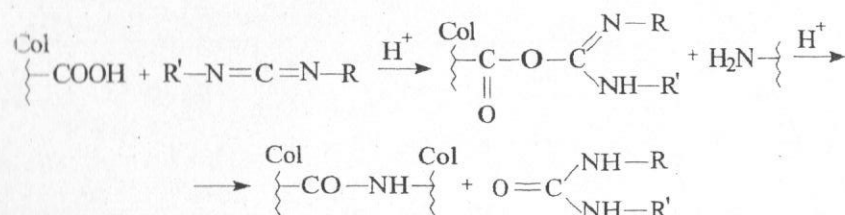
Reticularea colagenului cu poliizocianați se face cel mai frecvent cu hexameten diizocianat (HMDI) :



Reticularea are loc cu randament mult mai bun în absența apei și se recomandă, în acest sens, o serie de solvenți ca 2 – propanolul și dimetilsulfoxidul (DMSO) [202].

Reticularea cu agenți de cuplare neîncatenabili este cercetată în scopul obținerii de suporturi pentru domeniul ingineriei tisulare [203].

Carbodiimidele solubile și insolubile în apă sunt mai mult experimentate pe materiale colagenice:



Agenții de reticulare ai colagenului cu mecanism radicalic sunt monomeri polimerizabili care au aplicații mai ales în domeniul materialelor compozite.

Formarea legăturilor coordinative la reticularea materialelor colagenice se realizează cu săruri ale ionilor polivalenți și, mai ales, cu săruri de crom, aluminiiu, titan, fier, zirconiu și altele.

O bogată sursă de informații se găsește în domeniul tăbăcirii minerale a pieilor [162].

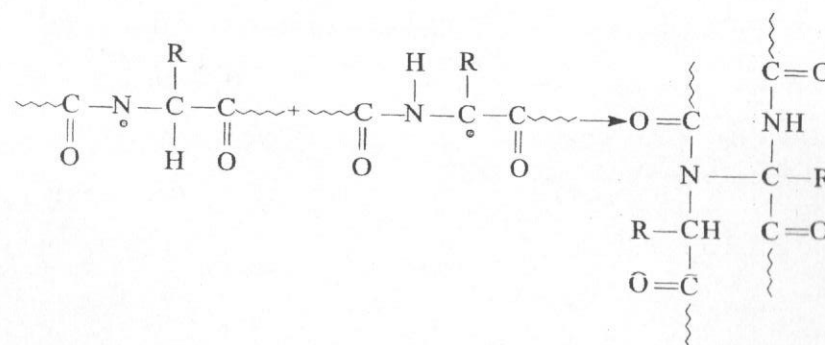
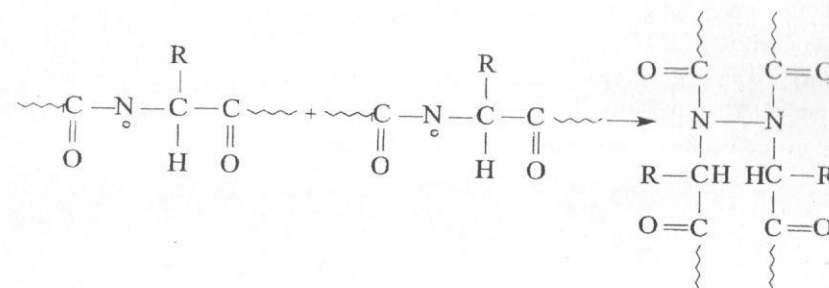
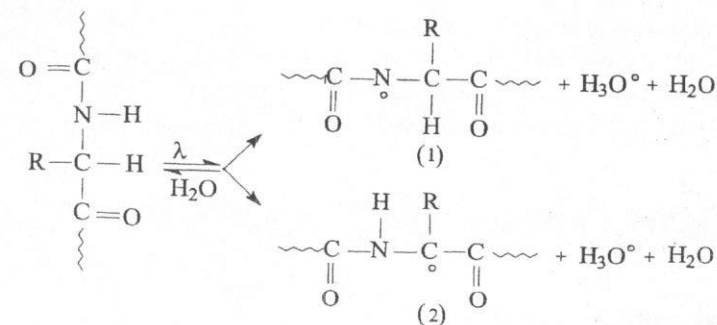
La tăbăcirea în crom a pieilor participă combinații policromice care formează cu grupele funcționale ale colagenului legături rezistente de covalență și de coordinație. Acest subiect va fi tratat la subcapitolul 12.16. (Utilizări ale materialelor colagenice).

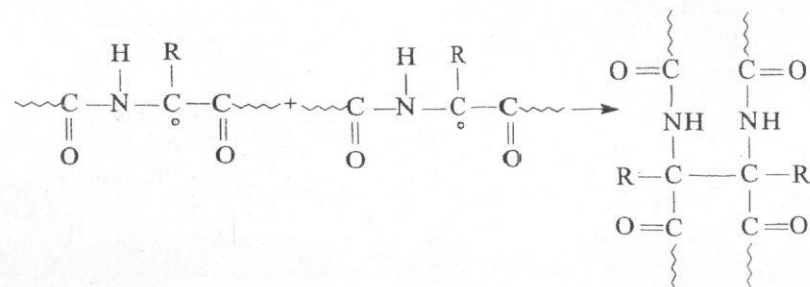
Formarea legăturilor de hidrogen în procesele de reticulare ale colagenului se realizează, mai ales, cu substanțe hidroxilfenolice, la tratarea cu tananți vegetali și sintetici, cu coloranți naturali și sintetici [204].

Reticularea fizică a colagenului cumulează sub acest termen procese cu ajutorul cărora se obține configurația tridimensională a materialelor colagenice, numai cu aport energetic și în absența oricărei substanțe chimice.

Reticularea fizică se referă la *reticularea cu radiații* (UV, X și γ), *reticularea în câmpuri de înaltă frecvență* (microunde) și *reticularea dehidrotermică*.

Reticularea colagenului în prezența radiațiilor, cu diferite tipuri de radiații, se consideră că are la bază un mecanism radicalic:





Mecanismul de inițiere și propagare a reacțiilor radicalice se bazează pe faptul că radiațiile acționează asupra moleculelor de apă prezente în structura materialelor colagenice, generând radicali hidroxilici care extrag un proton de la azotul peptidic sau de la carbonul α [136, 174, 175].

Principalii parametri ai reticulării cu radiații sunt: natura materialului colagenic, temperatura și durata expunerii la radiații [205].

La radiațiile cu raze X, ca și la folosirea microundelor, s-a observat o comportare similară.

Reticularea dehidrotermică este o denaturare termică avansată a colagenului, la temperaturi de peste temperatura de denaturare, cu eliminarea apei, care participă la stabilizarea structurii colagenului și la formarea unui număr mare de legături de hidrogen inter- și intramoleculare [206].

Reticularea enzimatică a colagenului se poate realiza cu participarea liazelor. Dintre enzimele testate, *transglutaminazele* se consideră că au dat cele mai bune rezultate [207]. Reticularea enzimatică, în prezent și în perspectivă, este recomandată, mai ales, în ingineria tisulară și pentru realizarea protezelor implantabile.

12.10. SOLUBILIZAREA COLAGENULUI

În țesuturile conjunctive, există, alături de fibra matură de colagen, alte două forme de colagen: *procolagenul* și *tropocolagenul* [208].

Prima formă, *procolagenul*, se găsește în fibroblaste și în lichidul extracelular. Se poate extrage cu soluții de sare neutră sau cu soluții tampon slab alca-line.

A doua formă este *tropocolagenul*, care este în curs de participare la formarea structurii cuaternare sau este integrat în structura cuaternară a colagenului. Acesta poate fi solubilizat prin tratare cu soluții de acizi diluați și, de aceea, se numește frecvent *colagen solubil în acid*.

Parțial acesta poate fi extras și cu soluții de săruri neutre.

Modul de preparare și de purificare a unei soluții de colagen variază cu scopul utilizării ei.

Astfel, cercetarea compoziției în aminoacizi sau determinarea secvenței aminoacizilor dintr-un lanț polipeptidic cer înlăturarea tuturor impurităților.

Eficacitatea procedeele de extracție a colagenului este apreciată pe următoarele căi:

1. Asemănarea între compoziția în aminoacizi a porțiunii solubile față de aceea a materialului inițial. Pot apărea unele diferențe relativ minore în ceea ce privește conținutul de tirozină.

2. Vâscozitatea și rotația optică a soluției de colagen este $[\eta] \approx 12-16 \text{ dl g}^{-1}$ și respectiv, $[\alpha]_D = 330^\circ$ la 370° .

3. Rezistența materialului extras la atacul enzimelor proteolitice poate duce la pierderea structurii helicoidale.

4. Capacitatea materialului solubilizat de a se reconstitui în forma de agregare foarte asemănătoare cu cea a substanței inițiale.

Colagenul extractibil din țesutul conjunctiv extras în condiții blânde, cu soluții de săruri neutre sau slab alcaine de fosfați și alte săruri, duce la obținerea unui gel vâscos, omniprezent al fazei extracelulare. La intensificarea extracției se detașează din țesutul conjunctiv agregate fibrilare mai puțin mature, care nu s-au ancorat suficient de structura fibroasă colagenică existentă.

La rece, soluțiile de colagen extrase cu soluții de săruri neutre încep să se disperseze mai slab decât cele obținute cu soluții diluate de acizi slabi.

Piez și colab. [209, 210, 211] au constatat, prin determinări cromatografice, că distribuția componentelor α , β , γ din colagenul de porc, șobolan și

om extras cu soluții acide, sunt semnificativ mai numeroase decât la extracția cu săruri neutre.

Deci, numărul legăturilor transversale intra- și intermoleculare este mult mai mare în colagenul extras cu soluții acide decât la extracția cu soluții de săruri neutre.

La prepararea soluțiilor de colagen, se obțin soluții polidisperse.

Pentru a se obține o soluție monodispersă sunt necesare ultracentrifugări prelungite și repetate asupra unor soluții diluate.

Dispersitatea soluțiilor de colagen este dependentă de modul de extracție.

Vâscozitatea intrinsecă a soluțiilor acide de colagen este cu 10–15% mai mare decât aceea a colagenului solubil în soluții de săruri neutre. Fessler a observat că heterogenitatea soluțiilor de colagen extras cu soluții de săruri neutre se datorește la trei fracțiuni:

- care formează fibre la temperatura de 37°C și care se dizolvă complet la răcire;
- care nu precipită la temperatura de 37°C;
- care formează ireversibil fibre la temperatura de 37°C [212, 213].

Pentru extragerea colagenului solubil în soluții de sare neutră sau aczi diluați au importanță, în primul rând, natura materiei prime (mai ales vârsta) și agentul de solubilizare. Cu creșterea vârstei, cele două forme de colagen solubil se găsesc într-o cantitate din ce în ce mai mică.

În tabelul 12.24 se prezintă variația conținutului de colagen solubil în soluții de săruri neutre și acizi diluați, în funcție de vârstă, din dermul pielii de porc și de vițel.

Tabelul 11.24.

Scăderea conținutului de colagen solubil cu vârsta

Tipul țesutului	Vârsta	Cantitatea de colagen dizolvat, %	
		În săruri neutre	În acid citric
Piele de porc	Nou născut	9,8	2,9
	2 săptămâni	7,2	2,9

8 săptămâni		3,8	2,3
13 săptămâni		3,8	1,9
9 luni		1,7	1,4
1,5 ani		1,6	1,4
2 ani		1,5	1,0
Piele de vițel	Nou născut	7,8	9,8
	4 săptămâni	6,7	6,3
	11 săptămâni	3,6	8,4
	19 săptămâni	3,0	5,2
	28 săptămâni	2,7	2,0
	1,5 ani	1,6	1,9
5 ani		0,9	0,7

12.10.1. SOLUBILIZAREA COLAGENULUI ÎN SOLUȚII DE SĂRURI NEUTRE

În anul 1951, J.H. Highberger a extras din piele de vițel o cantitate de colagen pe care a numit-o tropocolagen, utilizând o soluție alcalină de fosfat disodic [214].

I.Gross, J.H. Highberger și F.O.Schmidt, în anul 1955, au obținut soluții de colagen din piele de vițel proaspătă tratată cu soluții alcaline, la temperatura de 0–5°C.

În anul 1966, H.A. Kang, Y. Nagai, K.A. Piez și I. Gross [215] au propus o metodă de extracție a colagenului solubil, unanim acceptată ca metodă standard, pentru obținerea soluțiilor de colagen nativ.

Metoda preconizează utiliza-re-a pielii de vițel proaspătă, din care se alege numai stratul reticular al dermului. Aceasta se spală 3 ore cu apă distilată și se macină la temperatură scăzută, pentru a nu se produce denaturări asupra colagenului. Apoi, se face prima extracție cu o soluție de 1 M NaCl și 0,05 M Tris (hidroximetilaminometan) la temperatura de 4°C, timp de 24 ore, prin agitare continuă.

Raportul material colagen : soluție este 1:5.

Prin filtrare, se obține primul extract neutru (CN-1). Extracția se repetă și rezultă CN-2 (Fig.12.56.).

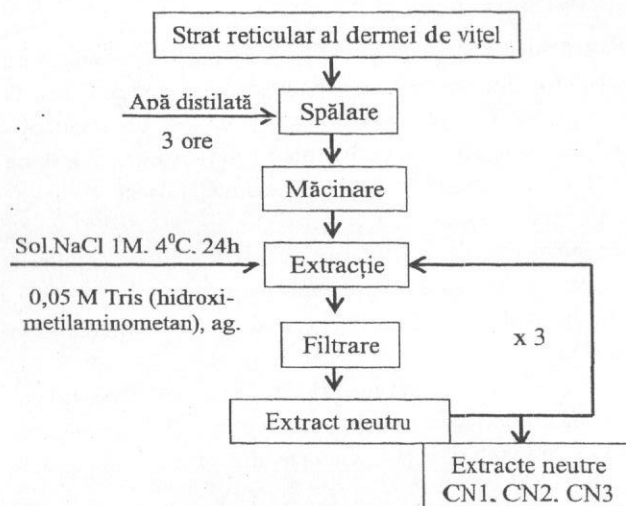


Fig.12.56. Schema fluxului de extracție a colagenului solubil [215]

Materialul colagenic este spălat cu apă distilată, timp de 24 ore; apa de spălare se adaugă la CN-2, iar materialul colagenic se supune unei extracții cu o soluție de 0,5 M acid acetic (raport 1:5), timp de 24 de ore, prin agitare continuă, la 4°C, apoi se filtrează și se obține extractul CA-1. Operația se repetă de 4 ori, rezultând : CA-2, CA-3, CA-4 și CA-5 (Fig.12.57.).

La extracție, și mai ales la CN-1 și CN-2, o dată cu colagenul trec în soluție și componente necolagenice (albumine, globuline, glicoproteine, mucopolizaharide etc.). Îndepărtarea acestora se efectuează prin precipitarea colagenului cu clorură de sodiu la pH=3-4.

În toate soluțiile se adaugă 10% clorură de sodiu, iar în CN-1 și CN-2 și acid acetic, pentru a coborî pH-ul la valori de 3-4.

Separarea precipitatelor de colagen se face prin centrifugare.

Precipitatele separate se redizolvă în soluții de 1% acid acetic și metodo-

logia de purificare a colagenului de componentele necolagenice se repetă de trei ori. După ultima redizolvare, soluțiile de colagen se încarcă în tuburi de dializă de viscoză și se dializează contra apei distilate, timp de trei zile.

Apa distilată se schimbă din 12 în 12 ore, temperatura fiind de 4°C. După dializă, soluțiile de colagen obținute au vâscozitatea ridicată, sunt clare și se supun uscării prin liofilizare. Pe această cale se extrage din pielea de vițel, proaspătă, obținându-se o soluție de 8-10% colagen (Fig.12.57.).

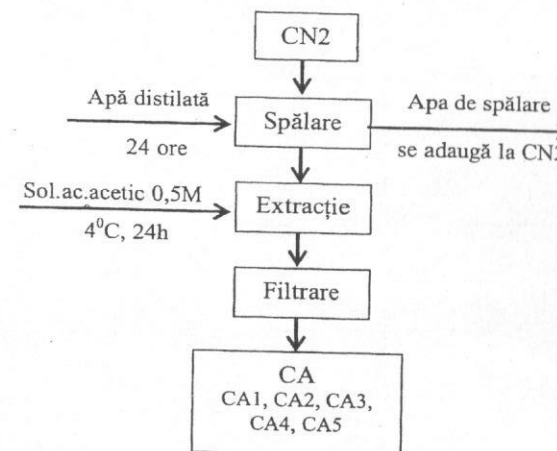


Fig.12.57. Schema fluxului de extracție a colagenului solubil [162, 215]

12.10.2. SOLUBILIZAREA COLAGENULUI ÎN MEDIU ACID

Încă din anul 1929, Y. Nageotte a extras colagen din pielea de vițel cu ajutorul acidului acetic.

V.N. Orechivici și colab. au extras din pielea de vițel cu soluții acide de citrat tampon, o fracțiune pe care a denumit-o procologen [162, 216]. În general, pentru solubilizarea colagenului s-au utilizat acizi organici, cei anorganici fiind folosiți numai în soluții tampon.

Solubilizarea colagenului cu acid acetic. S-a mai arătat că ionizarea acidului acetic se deosebește foarte puțin de ionizarea grupelor carboxilice ale colagenului. Din această cauză, mecanismul solubilizării va fi diferit de al altor acizi.

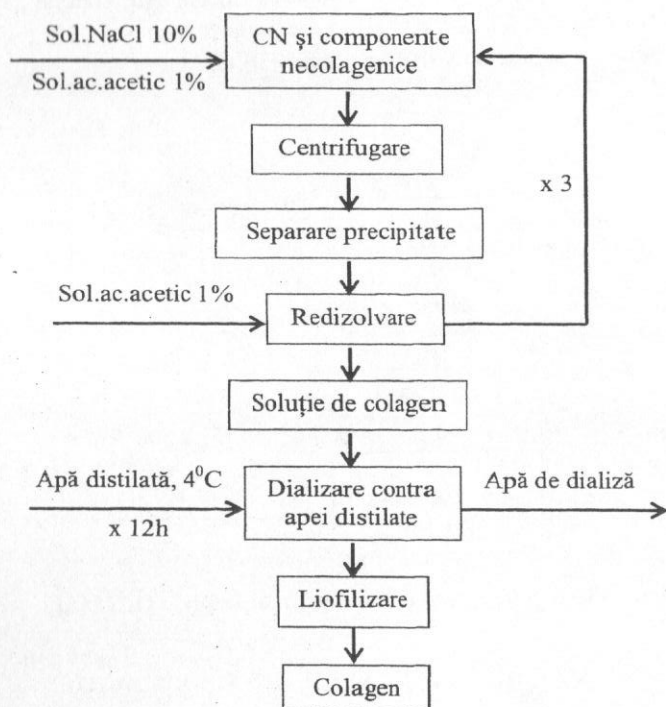


Fig.12.58. Schema fluxului de purificare a colagenului solubil [162, 215]

Se recomandă utilizarea soluțiilor diluate de acid acetic, în care stabilitatea moleculelor de colagen solubilizate nu este afectată de pH, așa cum se petrece în soluțiile concentrate. În soluții tampon de acid acetic-acetat de sodiu, cu $\text{pH} = 3,5-4,5$, crește cantitatea de colagen solubilizat, în comparație cu solubilizarea numai cu acid acetic (Fig.12.58.).

Solubilizarea colagenului cu acid citric. J.Engel a ajuns la concluzia că moleculele de colagen din pielea de vițel se denaturează în tampon citrat, la $\text{pH}=3,7$ și 38°C în două etape. În prima etapă, după 11 minute, structura triplului helix este distrusă și conformația sa de bastonaș rigid dispăre. În a doua etapă, lanțurile polipeptidice se despart în molecule separate, procesul de denaturare fiind complet după 90 de minute.

A. Courts face mențiunea că acidul citric pare să fie cel mai eficient dintre acizii alifatici cu moleculă mică în privința extracției colagenului.

Pentru dizolvarea colagenului în acid citric s-au efectuat experimentări la diferite concentrații de acid.

Concentrația de $0,45\text{M}$ este o concentrație critică, deoarece la această valoare acțiunea solubilizantă crește foarte mult, dar o dată cu aceasta se mărește și acțiunea de hidroliză asupra lanțurilor polipeptidice, dovedită pe cale viscozimetrică.

Peste concentrația de $0,8\text{M}$ acid citric colagenul este puternic hidrolizat.

Solubilizarea colagenului cu acid clorhidric. Acidul clorhidric este un acid tare, cu o constantă de ionizare mare și produce o umflare energetică a colagenului. La concentrații mici ($0,05-0,1\text{M}$), poate solubiliza până la $6-8\%$ colagen din pielea de vițel, producând efecte de hidroliză foarte reduse.

12.10.3. SOLUBILIZAREA COLAGENULUI INSOLUBIL

Colagenul prezintă o structură complexă și destul de rezistentă la acțiunea de solubilizare cu acizi. Responsabile pentru această insolubilitate sunt numeroasele legături chimice, diverse, care duc la alcătuirea structurii sale cuaternare, precum și interacțiunea colagenului cu compuși ce formează substanța fundamentală a țesutului conjunctiv.

Pentru a realiza solvirea colagenului insolubil, trebuie să se distrugă legăturile intermoleculare și să se păstreze cât mai intactă structura triplului helix.

Fără de cele menționate, merită atenție căile de solubilizare alcalin-acidă și enzimatică.

Solubilizarea alcalin-acidă a colagenului insolubil. A. Courts, R. Reed, G. Stainsby, A.G. Ward au tratat oase cu o soluție de 5% NaOH, saturată cu Na_2SO_4 , timp de 5 zile, la temperatura de 20°C , și apoi au putut să extragă până la 30% colagen cu o soluție tampon citrat sau acetat, la $\text{pH}=3,7$.

Materialul obținut l-au denumit *eucolagen* pentru a-l deosebi de *tropocolagen*, deși comportarea sa generală amintește de acesta.

După datele lui Gh. Cioca [162], 1kg șpalt de piele gelatină de bovine, neutralizat și spălat în prealabil, se tratează cu 3 l soluție de 10% NaOH, 3% NaCl și 3% Na_2SO_4 , timp de 48 ore, la temperatura de 20°C .

Șpaltul astfel tratat se supune spălării și apoi neutralizării cu 3 litri soluție ce conține 10g HCl; urmează o spălare, pentru a se elimina sarea formată la neutralizare și dizolvarea totală a colagenului în 10 litri de soluție de 1% acid acetic, timp de 24 de ore (Fig. 12.59.).

O astfel de soluție de colagen conține agregate de molecule, dar și fragmente de molecule de colagen și chiar aminoacizi, ceea ce arată că la tratarea alcalină se produce o hidroliză energetică asupra colagenului.

Solubilizarea enzimatică a colagenului insolubil. Pentru a se produce solubilizarea totală a colagenului, folosind enzimele proteolitice, este necesar un tratament preliminar, chimic sau termic, pentru a se produce o denaturare a colagenului, deoarece proteazele, în afara colagenazelor, nu degradează molecula de colagen nativ.

Tratamente chimice preliminare asupra coalgenului cu soluții alcaline (soluție de 10% NaOH + 1 M Na_2SO_4) sau cu soluții concentrate de săruri liotrope, ca KCNS, CaCl_2 , BaCl_2 , MgCl_2 etc., urmate de tratamente cu enzime proteolitice pot duce la solubilizarea totală a colagenului.

Sărurile de calciu și mag-neziu au efect activant al enzimelor proteolitice și se pot utiliza simultan cu enzimele în tratamentele de solubilizare a colagenului.

Agenții activi de suprafață adăugați la solubilizarea enzimatică măresc randamentul de colagen extras.

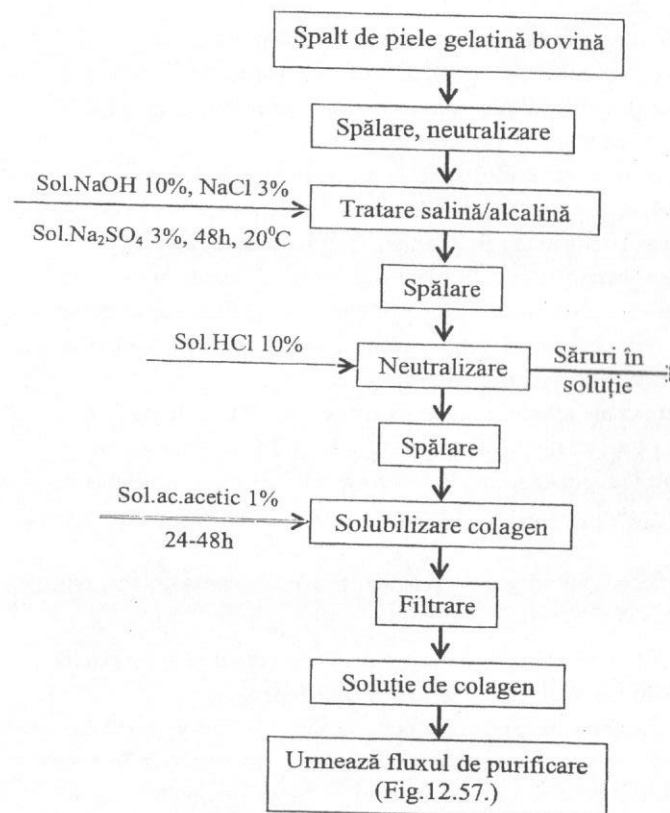


Fig. 12.59. Solubilizarea colagenului din șpalt de piele gelatină de bovine
L. Urban și Michal au obținut soluții de eucolagen din deșeuri de piele sau tendoane de animale, prin tratarea lor, mai întâi cu 10% NaOH și 1M Na_2SO_4 , timp de 48 de ore, la temperatura de 20°C și apoi solubilizarea într-o soluție de 0,5 M acid acetic. Masa moleculară a colagenului solubilizat a fost de 350000 – 450000.

Asocierea în reacția enzimatică a acizilor minerali sau organici (acidul clorhidric, acidul acetic, acidul citric, acidul lactic), care permit realizarea pH-ului optim de acțiune pentru enzime, cum este cazul pepsinei, contribuie la intensificarea procesului de solubilizare a colagenului.

Creșterea temperaturii colagenului până la temperatura de contracție sau superioară, favorizează solubilizarea sa la tratamente cu enzime proteolitice.

Pentru solubilizarea enzimatică a colagenului se utilizează o serie de proteaze. Având în vedere substanțele interfibrilare ale țesutului conjunctiv colagenic, care sunt constituite într-o anumită proporție din mucopolizaharide, alături de proteaze trebuie să fie prezente și alte hidrolaze, care acționează asupra legăturilor esterice, eterice, a compuşilor glicozil.

Dintre microorganismele ale căror proteaze sunt evidențiate în literatura, că pot participa în anumite situații la solubilizarea colagenului, sunt diferitele specii a genurilor: *Bacillus*, *Aspergillus*, *Penicilium*, *Streptomyces*; enzimele de origine animală ca: *pepsina* și *tripsina*; enzime de origine vegetală ca: *papaina* și *ficina*.

În literatura de specialitate se găsesc și studii privind izolarea colagenului din diferite animale marine [411-422].

Purificarea soluțiilor de colagen are drept scop îndepărtarea substanțelor necolagenice, dar și obținerea selectivă a tipurilor de colagen.

Îndepărtarea substanțelor necolagenice din extractul de colagen se realizează prin precipitarea colagenului cu clorură de sodiu. Concentrațiile în sare, în vederea precipitării colagenului s-au dovedit a fi în funcție de metoda de solubilizare folosită. Astfel, colagenul din soluțiile acide se precipită la concentrația de 2 M NaCl, iar colagenul din soluțiile cu pH neutru se precipită cantitativ la concentrația de 4 M NaCl. Pentru îndepărtarea substanțelor necolagene din soluțiile de colagen se poate folosi și cromatografia pe DEAE-celuloză.

Separarea tipurilor de colagen se realizează prin precipitări selective cu NaCl sau prin cromatografie [130]. Precipitarea selectivă cu NaCl se bazează pe diferențele de solubilitate a diferitelor tipuri de colagen în soluțiile de NaCl (tabelul 12.25.).

Separarea tipurilor de colagen prin cromatografie se face după îndepărtarea substanțelor necolagenice prin tratare cu NaCl. Cromatografia se efectuează pe coloane cu schimbători de ioni (CM-celuloză și DEAE-celuloză).

Tabelul 12.25.

Precipitarea selectivă cu NaCl a unor tipuri de colagen

Concentrația În NaCl (M)	Solventul	
	Acid diluat (pH = 3)	Salin neutru (pH = 7,4)
0,7	Tip I, II, III	
1,2	Tip IV, V, XI	
1,8		Tip III
2,5		Tip I
4,0		Tip II, V, XI

Proprietățile fizico-chimice ale soluțiilor de colagen sunt influențate de natura materiei prime, solventul utilizat, tratamentul preliminar, precum și de cei-alți parametri de lucru.

Dacă o soluție de tropocolagen poate fi considerată ca monodispersă, în cazul soluțiilor totale de colagen, obținute din colagenul insolubil, este vorba de o polidispersie care pornește de la fracțiuni moleculare până la ageritate de mai multe molecule.

Soluțiile de colagen conțin cel mult 3-4% substanță uscată, în schimb au o vâscozitate foarte ridicată. Din punct de vedere reologic au o comportare newtoniană, descrisă de modelul reologic Ostwald de Wealle :

$$\tau_{xy} = K \gamma^n / t, T$$

unde: τ_{xy} - tensiunea de forfecare, N / m², Pa;

γ - viteza de forfecare, (dy / dt), s⁻¹;

t - timpul, T - temperatura, K - indicele de consistență,

n - depinde de toți parametrii care influențează vâscozitatea soluțiilor de colagen (concentrație, pH, timp de maturare, temperatură, natura

materiei prime, natura solventului etc.);

K – depinde de concentrație, după o funcție polinomă de forma:

$$K = a_0 + a_1c + a_2c^2 + \dots$$

În tabelul 12.26. se dau valorile lui K și n din modelul reologic Ostwald de Weale, în funcție de concentrația soluției de collagen.

Tabelul 12.26.

Variația lui K și n în funcție de concentrație

Concentrația soluției de collagen g / 100 ml	K	n
3,5	1231,0	0,171
2,0	489,0	0,200
1,8	436,6	0,208
1,5	295,2	0,222
1,0	112,3	0,271

Dacă se studiază comportarea soluțiilor de collagen în funcție de timp, se constată că, odată cu trecerea timpului, au tendința de a li se crește mult vâscozitatea.

Acest fenomen se datorește asocierii macromoleculelor sub forma unor rețele tridimensionale, care se realizează prin legături electrovalente, legături de hidrogen și forțe van der Waals.

Ca și în cazul tuturor polielectroliților, vâscozitatea soluțiilor de collagen este influențată de pH.

Vâscozitatea minimă este la pH_i. Curba variației vâscozității soluțiilor de collagen în funcție de pH are o formă asemănătoare curbei de umflare a collagenului în funcție de pH.

Majoritatea materialelor collagenice aparțin clasei de fluide pseudoplastice ($n < 1$).

Din punctul de vedere al dependenței de timp, a variației tensiunii de forfecare în funcție de viteza de forfecare, soluțiile de collagen sunt *tixotrope*, iar unele sunt *reopexice*.

Mentținând condițiile de solicitare la valoare constantă (γ , t), precum și a parametrilor fizico-chimici: concentrație, pH, tărie ionică, temperatură, se poate evidenția influența structurii collagenului asupra vâscozității aparente η_a a soluțiilor.

Creșterea temperaturii determină scăderea vâscozității aparente cu o intensitate care depinde de modificările conformaționale pe care le poate suferi collagenul în mediu apos.

PH-ul și tăria ionică sunt cei mai importanți factori capabili să modifice vâscozitatea soluțiilor de collagen.

Acești factori modifică volumul specific al moleculelor aflate în mediul de dispersie.

În soluții normale, collagenul are o conformație în formă de ghem.

Dependența vâscozității reduse de concentrație se poate aproxima cu relația [136, 217, 218]:

$$\eta_{red} = [\eta] + K_H [\eta]c$$

unde, K_H = constanta de interacțiune Huggins.

La soluțiile cu efect polielectrolitic, diluarea determină trecerea de la conformații izometrice la cele anizometrice. Aceasta duce la o rezistență hidraulică sporită la trecerea prin capilara vâscozimetruului și implicit la creșterea vâscozității.

Intensitatea efectului polielectrolitic poate fi aproximată cu modelul reologic a lui R.M. Fuoss [219–222]:

$$\eta_{rel} = \frac{A}{1 + B\sqrt{c}}$$

unde, A și B sunt constante ce exprimă efectul de ecranare al contraionilor din interiorul ghemurilor.

Uscarea prin liofilizare și atomizare a soluțiilor de collagen influențează comportarea reologică a collagenului redizolvat prin scăderea vâscozității intrinseci și a masei moleculare medii [223]. Aceste modificări survin ca urmare a denaturării conformației elicoidale prin trecerea sub formă de ghem și a proceselor de scindare crioscopică și termică a lanțurilor polipeptidice.

La iradierea compușilor macromoleculari, efectele principale sunt ionizarea și excitarea macromoleculelor, conducând în final la formarea de radicali. Rezultatul final al acțiunii radiațiilor este procesul de structurare sau destruc-turarea al acestor macromolecule [224].

În funcție de condițiile de iradiere (doza, temperatura, pH-ul, mediul în care se găsește substanța care se iradiază, prezența oxigenului etc.), poate avea loc structurarea sau destruc-turarea.

Prin iradierea collagenului cu radiații γ , la doze mari, se produce o scădere a temperaturii de denaturare și o creștere a cantității produșilor de distrucție [225, 226]. S-a constatat că la iradierea cu radiații γ în doze de 1.10^7 rad. fibrele de collagen se distrug.

Soluțiile acide de collagen iradiate cu radiații γ în doze de 3.10^5 rad își reduc vâscozitatea aproape la jumătate, ceea ce dovedește că are loc o degradare, iar la iradierea cu doze mici se produce o reticulare a collagenului în soluții apoase.

Determinarea masei moleculare medii a substanțelor proteice se poate face prin mai multe metode: cromatografie, osmometrie, difuzia luminii, ultracentrifugare, care sunt procedee laborioase.

Una dintre cele mai simple căi este metoda vâscozimetrie, utilizând relația Mark-Houwink:

$$[\eta] = KM^\alpha$$

Valorile K și α din relația Mark-Houwink pentru determinarea masei moleculare medii, pe calea vâscozimetrie sunt date în tabelul 12.27.

Tabelul 12.27.
Valorile pentru K și α din relația Mark-Houwink

Materialul colagenic	K		α	Bibliografie
Eucolagen	$2,50 \cdot 10^{-9}$	1)	1,74	231
Colagen nativ extras cu soluții diluate de săruri neutre	$1,58 \cdot 10^{-9}$	2)	1,80	232
Gelatină	$2,90 \cdot 10^{-4}$	3)	0,62	233
Hidrolizat de collagen	$2,97 \cdot 10^{-3}$	4)	0,45	233
	$1,85 \cdot 10^{-3}$	5)	0,36	234

Notă: 1) în soluție de 0,5 M acid acetic; 2) în soluție de 0,5 % NaCl;
3) în soluție de 2 M KSCN; 4) în apă distilată;
5) în soluție de 0,5 M KCl.

Folosirea unei astfel de relații este condiționată de cunoașterea vâscozității intrinseci și a valorii constantelor K și α , în raport cu condițiile de experimentale adoptate.

Vâscozitate intrinsecă se determină din reologia soluțiilor diluate de substanțe proteice [227].

Pentru determinarea constantelor K și α , sunt metode care prevăd fracționarea soluției proteice polidisperse în 6-7 fracțiuni cu mase moleculare medii apropiate, iar fracțiile, la rândul lor, sunt caracterizate din punctul de vedere al masei moleculare medii prin metode ca: difuzia luminii, cromatografia, ultra-centrifugarea etc. [228 - 230].

12.11. RECONSTITUIREA COLAGENULUI DIN SOLUȚIE

Moleculele de collagen în soluție, în anumite condiții favorabile, au tendința de a se reagrega pentru a se reconstitui fibrilele de tip nativ, deci de a se rearanja în forma cea mai stabilă.

În urma tratamentelor de solubilizare, trec în soluție nu numai molecule în-

regi de colagen, ci și fracțiuni, lanțuri polipeptidice individuale. De aceea, într-o primă fază, se vor reforma moleculele de colagen din lanțurile polipeptidice individuale și, în continuare, are loc reagregarea moleculelor pentru a se forma fibrilele de tip nativ, cu striaiile caracteristice.

Reconstituirea colagenului are două faze distincte: *renaturarea* și *reagregarea*.

Dacă în cursul renaturării lanțurile polipeptidice nu-și mai pot relua pozițiile spațiale corecte, unul față de celălalt, se produce o largă agregare moleculară, care conține regiuni cu structură de triplu helix în alternanță cu structuri dezordonate.

Renaturarea și reagregarea pot fi favorizate de o serie de agenți fizici sau chimici (temperatura, pH-ul, tăria ionică, agenții de reticulare, substanțele tanante, sărurile neutre etc.).

Formarea fibrililor prin reconstituirea lor din soluția de colagen este asemănătoare cu procesul de recristalizare a sărurilor greu solubile.

Energia de activare în perioada de reconstituire a fibrililor de colagen este de 27 kcal/mol la pH=7,1, tăria ionică=23 și concentrația soluțiilor de 0,05%.

Moleculele de tropocolagen pot fi agregate în cinci tipuri principale de structuri reconstituite, caracterizate la microscopul electronic prin lungimea perioadei de repetare a benzilor transversale:

- segmente cu perioadă alungită (SLS) de 2 800 Å;
- fibrile cu perioadă alungită (FLS) de 2 800 Å;
- fibrile de tip nativ cu perioada de 650–700 Å;
- fibrile cu periodicitatea de 220 Å;
- fibrile cu striaii neregulate.

Toate aceste tipuri de structuri sunt dependente de distribuția încărcărilor pozitive și negative de pe suprafața moleculei de tropocolagen [235].

Reconstituirea colagenului din soluție sub influența temperaturii. În timpul procesului de renaturare, lanțurile polipeptidice denaturate sunt în echilibru cu moleculele native reformate și cu agregatele acestora.

La temperaturi coborâte de 4–10°C, apar componente γ , în care trei lanțuri polipeptidice sunt legate prin legături covalente intramoleculare, fără a se

forma triplu helix. La 25°C agregatele sunt nestabile și echilibrul este favorabil formării moleculelor native.

Prin ridicarea temperaturii soluției de colagen la 26–30°C se ajunge la precipitarea acestuia sub forma unui gel opac ce constă din fibrile foarte fine. Dacă fibrilele stau mai mult timp în această stare, capacitatea de redizolvare dispăre. Acest fapt demonstrează tendința macromoleculelor de colagen de a realiza starea cea mai stabilă prin consolidarea structurii cu ajutorul legăturilor transversale.

În figura 12.60. este prezentat efectul temperaturii asupra opacității unei soluții de colagen. Opacitatea relativă a fost considerată drept măsură a înaintării procesului de precipitare.

Experimentările s-au făcut pe colagen solubilizat din tendonul cozii de șobolan, care este mai puțin reticulat decât cel din pielea aceluiași animal. Din figura 12.60. se observă că pentru toate temperaturile studiate, celelalte condiții fiind constante, aspectul curbelor este foarte asemănător.

Izoterme de acest tip sunt obținute în timpul cristalizării monomerilor și polimerilor puri.

La aceeași valoare a temperaturii, forma, grosimea și alte caracteristici ale fibrei precipitate depind de pH, tăria ionică, de concentrația soluției și de durata de formare. În tabelul 12.28. se prezintă câțiva dintre acești parametri.

La scăderea temperaturii, se micșorează viteza de precipitare, dar crește grosimea fibrililor.

H. Hörmann arată că la trei ore după denaturare, au loc procese de renaturare foarte importante.

La 36°C gradul de renaturare este mai ridicat decât la 20°C. Intensitatea procesului de renaturare este în funcție de temperatura la care a avut loc denaturarea.

Cu cât temperatura la care are loc procesul de denaturare este mai ridicată, cu atât gradul de renaturare este mai redus.

Wood și Keech au examinat la microscopul electronic distribuția diametrelor fibrililor realizați din soluția de colagen de tip nativ prin precipitare izo-

termică, în soluții tampon (pH=6-8), la temperaturi cuprinse între 21 și 37°C [113, 237].

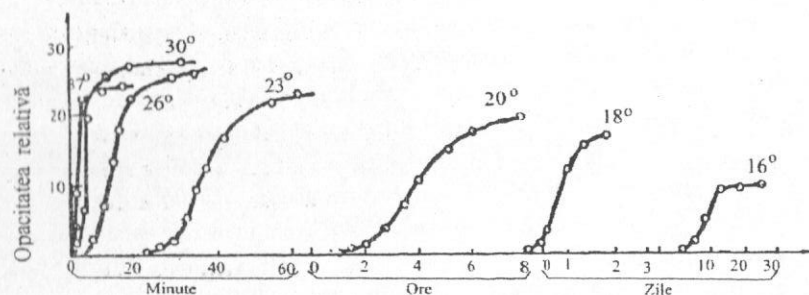


Fig. 12.60. Efectul temperaturii asupra opacității relative (exprimată în unități ale scalei electrofotometrice) în funcție de timp, pentru o soluție de 0,1% collagen la o forță ionică (0,5 M $\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{K}_2\text{HPO}_4$) și pH=7,5 constante (113, 236)

Tabelul 12.28.

Influența condițiilor de precipitare asupra grosimii fibrelor

Nr. crt.	Condiții de precipitare			Grosimea, Å	Limitele grosimii, Å
	pH	Tărie ionică	Temperatură °C		
1.	7,1	0,13	25	900	200 - 1 700
2.	7,1	0,23	25	1600	700 - 2 800
3.	7,1	0,31	25	2500	800 - 4 100
4.	6,0	0,23	25	1100	500 - 2 000
5.	7,1	0,23	21	2500	1800 - 4 800
6.	8,0	0,23	25	800	100 - 1 400
7.	7,1	0,23	27	500	200 - 1 200

Fibrili cu diametru mai mare se formează la temperaturi joase și pH scăzut, dar și la tărie ionică ridicată și pH neutru.

Studiile izotermice au demonstrat că formarea fibrililor de collagen de tip nativ au loc în două etape: perioada de lag sau de inducție, urmată de perioada de dezvoltare rapidă a precipitării.

Asemenea cinetici se implică în procesele de nucleație și de creștere. Procesele de nucleație au caracteristici specifice care le disting de procesele fizice și chimice.

Rolul polielectroliților la precipitarea collagenului. Collagenul poate fi reconstituit la fibrile de tip nativ în absența adaosului de polianioni. Acest fapt arată că este puțin probabil ca mucopolizaharidele să joace un rol direct în formarea fibrililor „in vivo”.

Este știut că mucopolizaharidele cauzează precipitarea collagenului din extractele tisulare peste pH=3-4. Condroitin sulfatul, acidul hialuronic, kerato-sulfatul și heparinsulfatul la pH neutru duc la formarea slabă sau de loc a fibrililor de collagen de tip nativ.

Wood, lucrând la temperatura de 25°C, într-un studiu asupra efectului polianionilor, arată că concentrația foarte coborâtă a sulfatului de condroitină A și C și keratosulfatului se accelerează faza de nucleație și rata dezvoltării fibrililor, în timp ce heparina, acidul deoxiribonucleic și o serie de sulfați de dextran, cu diferite greutăți moleculare și grade de sulfatare, au un efect opus [113, 238].

Observațiile lui Keech [113, 239] pe baza studiilor electrono-microscopice arată că acceleratorii de precipitare produc fibrile subțiri, în timp ce prezența in-hibitorilor duce la fibrili mai groși.

Toole și Lowther au descris precipitarea cu condroitin sulfat a collagenului extras cu soluție acidă. La 40°C și pH-ul fiziologic are loc precipitarea instantanee a aproximativ 2/3 din collagenul total cu formare de fibrili de tip nativ [240].

Reconstituirea collagenului din soluție sub influența substanțelor deshidratante. M.P. Vasiliev și colab. au studiat precipitarea collagenului din soluție cu etanol, acetonă și soluții concentrate de săruri neutre. Soluțiile de collagen au fost preparate prin solubilizarea pielii gelatină de bovine cu soluție de acid acetic.

Pentru fiecare sare neutră există un prag de precipitare, adică cea mai mică concentrație de sare din soluție la care începe precipitarea colagenului.

Valoarea acestor concentrații pentru câteva săruri neutre este: 0,4–0,5M/l pentru soluția de NaCl; 0,3M/l pentru $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ și 0,12 M/l pentru Na_2SO_4 . Valorile respective corespund puterii de deshidratare în șirul lui Hoffmeister.

Adăugarea sărurilor menționate nu conduce la modificări ale pH-ului soluțiilor și din această cauză capacitatea de a precipita colagenul se explică prin faptul că acțiunea de deshidratare se intensifică cu creșterea puterii ionice a soluțiilor.

Acetona utilizată ca agent de precipitare a colagenului din soluție are acțiune optimă la pH = 3,2–3,6.

În tabelul 12.29. se prezintă variația vâscozității soluției de colagen la diferite valori ale pH-ului și concentrații în acetonă utilizate la precipitare.

Tabelul 12.29.

Variația vâscozității unei soluții de 1,1% colagen, în funcție de conținutul în acetonă adăugat la precipitare, la diferite valori de pH (vâscozitatea este dată în poise)

Cantitatea de acetonă, %, raportată la soluția de colagen	pH-ul		
	3,12	2,9	2,56
0	41,0	21,0	–
2	41,8	21,0	11,7
5	71,8	28,0	10,0
10	141,0	28,9	6,2
15	282,0	34,8	6,9

Alcoolii și sărurile neutre micșorează mult constanta dielectrică a soluțiilor de colagen, măbind forțele electrostatice dintre molecule și aceasta ușurând formarea legăturilor de hidrogen în structura colagenului.

12.12. GELURI, PASTE, HIDROLIZATE

12.12.1. GELURI

Gelurile sunt sisteme coloidale solide, tridimensionale, cu o mare suprafață de separație activă, datorită structurii lor capilare. Gelurile pot fi umede (*liogeluri*), de obicei *elastice* și geluri uscate (*xerogeluri*), de obicei *rigide*.

Între gelurile elastice și cele rigide, există o a treia categorie, gelurile *tixotrope*, care se deosebesc din punct de vedere mecanic (tixotropia este fenomenul de fluidizare sub acțiunea unei solicitări mecanice exterioare și de întărire la încetarea solicitării).

Prepararea gelurilor poate decurge în mod spontan sau prin acțiunea anumitor *factori* sau *adaosuri*. Atât într-un caz, cât și în celălalt, procesul de transformare a solurilor în geluri se numește *gelatinizare* sau *gelificare*.

Factorii și adaosurile cele mai importante care se aplică pentru obținerea gelurilor prin gelatinizare sunt :

- variația temperaturii, care în cazul gelurilor colagenice, se coboară pentru micșorarea stabilității solilor din care provin;
- tratarea cu săruri, în deosebi electroliți, care urmează regulile coagulării solilor liofili sau liofobi, după caz; un factor chimic important pentru gelatinizarea cu adaosuri este pH-ul;
- înlocuirea dizolvantului (adăugarea așa-numiților “nedizolvanți”);
- prin unele reacții chimice, cum sunt îndeosebi reacțiile de polimerizare sau policondensare.

Gelatinizarea se deosebește de coagulare prin structura produsului rezultat, care în cazul gelurilor, trebuie să fie o masă coerentă formată din două corpuri în stare de agregare deosebită. De asemenea, se formează geluri și prin continuarea procesului de coagulare, prin legarea particulelor mari între ele prin valențe reziduale sau forțe van der Waals.

Aceste geluri, formate prin valențe secundare, sunt întotdeauna moi sau tixotrope, spre deosebire de gelurile formate prin legături covalente, în urma unor reacții chimice de polimerizare sau policondensare, care sunt geluri fibroase, rezistente.

La trecerea din stare de sol în stare de gel a dispersiilor coloidale, stabilitatea solilor trebuie în prealabil să se micșoreze, într-o anumită măsură, astfel ca sistemul rezultat, gelul, să nu se transforme prea repede în forma finală, cea mai stabilă termodinamic.

Condițiile principale pe care trebuie să le îndeplinească orice sistem rezultat prin gelatinizare, spre a deveni un gel sunt următoarele: să fie un sistem coloidal, nefluid și ambele faze din care este format să fie continue.

Gelurile nu sunt sisteme complet stabile din punct de vedere termodinamic, deși formarea lor, în urma creșterii numărului de legături chimice, este însoțită de o creștere a entropiei.

În geluri au loc o serie de fenomene, tipic coloidale, datorită instabilității lor, cum sunt: tixotropia, sinereza, îmbibarea etc.

Gelurile mențin și după formarea lor, majoritatea proprietăților coloidale ale solilor din care au provenit, cum sunt efectul Tyndall, difuziunea, conductivitatea electrolică etc., cu toată creșterea foarte mare a vâscozității prin gelatinizare.

Gelurile mai posedă și o serie de proprietăți ca: fenomenele de structurare (deformare) mecanică, adsorbția, histereza adsorbției vaporilor, îmbibarea și sinereza.

Gelurile au, în general, o diagramă de deformare mecanică aparținând celui de al treilea tip reologic: tipul sistemelor elastoplastice cu limită de curgere, al cărui model mecanic analogic este prezentat în figura 12.61. [241].

Gelurile pot prezenta și fenomenele de *tixotropie*, *reopexie* și *dilatanță*.

Există geluri macromoleculare tixotrope, tixotropia datorându-se fie valențelor secundare slabe, care se pot desface în mod reversibil, fie unui aranjament diferit al particulelor.

Astfel de geluri macromoleculare, de valențe secundare, formează gelatina, colagenul, agaragarul, pectina etc. În toate aceste geluri, legăturile de valență secundară, desfăcute prin acțiunea mecanică exterioară, se refac în mod spontan după încetarea solicitării, restabilindu-se structura rigidă (nefluidă) a gelului.

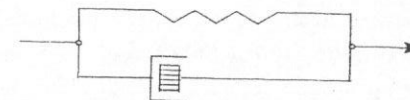


Fig.12.61. Modelul mecanic (analogic) al corpului elastoplastic—(solid Kelvin) caracteristic gelurilor (model Hooke–Newton) sau model Voigt legat în paralel [241].

Toate comportările mecanice ale corpurilor elastoplastice, ca și a solilor din care provin, sunt urmare a fenomenului de relaxare care constă din regruparea sau orientarea particulelor componente.

Adsorbția vaporilor de apă în geluri are loc ca efect al condensării capilare izoterme de adsorbție și este continuată, în prezența unei cantități mai mari de condensat, prin fenomenul de îmbibare.

În gelurile de valențe slabe cum sunt cele de gelatină, colagen, agar-agar etc., poate avea loc o îmbibare totală. Îmbibarea totală poate duce la prelungirea contactului dintre dizolvant și gelul îmbibat până la dizolvare.

12.12.2. PASTE

Pastele sunt sisteme disperse formate dintr-o pulbere fină și o cantitate mică de solvent care udă pulberea.

Pastele se mai clasifică după gradul de uscare ca și gelurile în: *liopaste* și *xeropaste*. Între aceste două tipuri de paste sunt pastele *tixotrope*, care în mișcare, se comportă ca suspensii, iar în stare de repaos ca liopaste, menținându-și forma.

Amestecurile de geluri și de paste formează sisteme mixte denumite *geluri-paste* și au proprietăți intermediare între cele două sisteme.

Cea mai importantă proprietate a pastelor, care le deosebește de suspensii este plasticitatea. Cele mai cunoscute paste sunt paste cosmetice, paste alimentare, paste ceramice în care se regăsește colagenul și gelatina, paste de lianți în construcții etc.

Pastele se prepară după diferite rețete, care au drept scop să confere o anumită fluiditate și consistență produsului rezultat.

Cele mai importante proprietăți ale pastelor, de care depind toate comportările și aplicațiile lor sunt: caracteristicile particulare (masă, formă, dimensiuni, polidispersitate), vâscozitatea, energia de adeziune față de un lichid sau energia de adeziune proprie.

12.12.3. HIDROLIZATE

Supunând materialele colagenice la temperaturi ridicate, în mediu apos, cu sau fără adaos de acizi, baze sau săruri liotrope, se produce hidroliza mai întâi până la polipeptide, iar prin intensificarea tratamentului se poate ajunge până la aminoacizi [242, 243].

În subcapitolele anterioare s-a arătat că proporția de colagen solubil din dermul pielii, cartilaje, tendoane este redus și scade cu vârsta animalelor sau a omului. Pe de altă parte, fibrele de colagen se pretează la o arie mai restrânsă de utilizare. De aceea, pentru creșterea cantității de colagen sub formă de soluție se practică hidroliza materialelor colagenice bogate în colagen insolubil, așa cum este dermul pielii animalelor (piei de bovine, porcine etc.), a deșeurilor de piele bogate în colagen și pentru scopuri speciale și a altor materiale colagenice.

Această solubilizare a colagenului insolubil, care are loc în urma unui tratament chimic sau enzimatic, produce ruperea legăturilor covalente transversale (amidice, esterice, eterice, baze Schiff) și mai puțin legăturile C-C din structura colagenului, rupere care implică participarea apei, ceea ce face ca procesul chimic să poarte numele de hidroliză.

Hidroliza colagenului insolubil este interpretată ca un proces catalitic în care catalizatorul îl constituie H^+ sau OH^- (hidroliză acidă sau bazică), dar poate avea loc și în mediu apos la temperatură ridicată în absența unui catalizator.

Mecanismul după care se conduce procesul de hidroliză a colagenului este complex, deoarece se referă la legături chimice diferite.

Factorii principali care intervin în procesul de hidroliză a colagenului sunt: temperatura, pH-ul mediului datorat concentrației agentului de cataliză și durata de tratament. Prezența clorurii de sodiu sau a sulfatului de sodiu contribuie

la reducerea acțiunii catalizatorului prin scăderea concentrației ionilor OH^- sau H^+ .

Intensitatea procesului de hidroliză este reglată cu ajutorul celor trei parametri menționați. Se pot obține hidrolizate cu mase moleculare medii mai mari sau mai mici decât masa moleculară a moleculei de colagen, până nivelul masei moleculare medii a aminoacizilor.

Hidrolizatele de colagen se obțin frecvent din deșeuri de piele de bovine bogate în colagen și, pentru scopuri speciale, din tendoane, cartilaje, ligamente de bovine.

Drept catalizatori se folosesc frecvent acidul clorhidric sau hidroxidul de sodiu. Așa cum s-a mai arătat, acizii produc o hidroliză mai intensă decât alcaliile, dar cu toate acestea, duc la mai puține modificări la nivelul aminoacizilor, comparativ cu hidroliza alcalină.

Materialul colagenic ce urmează a fi supus hidrolizei se spală de impurități, se îndepărtează substanțele alcaline care de obicei le conține, se mărunțește, se supune hidrolizei în autoclave, în mediu apos, cu sau fără adaos de agenți catalizatori, la temperatura și durata stabilite, după care urmează decantarea, neutralizarea, filtrarea și atomizarea.

Hidrolizatele de colagen sunt amestecuri de polipeptide, care cel mai frecvent au o masă moleculară medie de 90000–95000 și care poate ajunge la câteva sute, în funcție de intensitatea factorilor care produc hidroliza.

Hidroliza colagenului poate avea loc și în prezența anumitor enzime proteolitice.

La hidroliza enzimatică influențează natura enzimei, concentrația sa, durata de tratament, temperatura și pH-ul optime de acțiune ale enzimei.

12.13. EFECTUL RADIĂȚIILOR ASUPRA COLAGENULUI

12.13.1. INTRODUCERE

Omul este expus la radiații solare, mai exact, la lumina vizibilă acompaniată de radiații invizibile (ultraviolete, infraroșii, microunde, unde radio, raze X și raze γ) de la apariția sa pe pământ.

Viața pe pământ depinde de o bandă îngustă a radiațiilor solare, cuprinsă în spectrul electromagnetic, care ajunge la suprafața pământului. Radiațiile solare care străbat atmosfera sunt cuprinse între lungimile de undă de 2900 și 14000 Å și mai mult, în cea mai mare parte a lor nu sunt nocive cu excepția radiațiilor ultraviolete.

Spectrul solar cuprinde trei zone: radiațiile infraroșii (IR), care reprezintă 64%, radiațiile vizibile (V) reprezintă 35% și radiațiile ultraviolete (UV) reprezintă 1%.

Radiațiile electromagnetice sunt *ionizante: radiațiile cosmice, razele X și razele γ* și *radiații neionizante: radiațiile luminoase, radiațiile infraroșii, radiațiile ultraviolete* (sunt ionizante cu lungimile de undă mai mici de 100 nm), radiațiile mergând de la *frecvențe foarte înalte până la frecvențe extrem de joase*.

Radiația electromagnetică este constituită dintr-un câmp electromagnetic variabil, care se propagă, în substanțe sau în vid, sub formă de unde transversale. Radiațiile electromagnetice interacționează cu substanța producând numeroase efecte de natură fizică (încălzire, presiune, ionizare, luminescență etc.), chimică (descompunere, sinteză, etc.), biologică (fotosinteză, mutații etc.) [244, 245, 246, 247, 248].

Spectrul radiațiilor electromagnetice este împărțit după criteriul lungimii de undă în câteva domenii: radiații γ , radiații X, radiații ultraviolete, lumina vizibilă, radiații infraroșii, microunde, unde radio.

Razele X sunt unde electromagnetice ionizante a căror lungime de undă este cuprinsă între aproximativ 5 picometri și 10 nanometri.

Razele γ sunt de aceeași natură cu razele X și au unde foarte scurte, mai mici de 5 picometri.

Distincția între razele X și razele γ vine de la modul lor de producere: razele X sunt fotoni produși de electronii atomilor, în timp ce razele γ sunt produse de nucleii atomilor.

Razele X erau cunoscute pentru ionizarea gazelor, impresionarea plăcilor fotografice, să producă stăluire unor cristale.

Razele X pătrund ușor în materiile solide, puțin dense și constituite din elemente ca: C, O, H, N; ele sunt ușor absorbite de materialele solide dense,

constituite din elemente grele. Astfel, traversează ușor carnea și sunt oprite de oase la radiografie. Sunt ușor absorbite de aerul atmosferic. Energia importantă a protonilor provoacă ionizarea atomilor, deci sunt radiații ionizante, aceasta dă naștere la fenomenul de fluorescență X.

Radiațiile γ sunt ionizante și mai penetrante decât radiațiile α și β .

Radiațiile ultraviolete au acțiune nocivă asupra organismului și, mai ales, asupra tegumentelor producând fotodermatozele. Radiațiile ultraviolete, în spectru, încep acolo unde sfârșește percepția ochiului uman și în general reprezintă porțiunea din spectrul solar situată între aproximativ 100 Å și 4000 Å. Limita inferioară este imprecisă, deoarece ultravioletele (UV) cu lungimile de undă foarte mici au aceleași proprietăți ca și cele mai moi raze X.

Ochiul uman nu percepe în ultraviolet însă aceste radiații sunt periculoase pentru ochi și, în doze mari, pentru întregul organism.

În raport cu lungimea de undă radiațiile ultraviolete se împart în lungi (UVA), medii (UVB) și scurte (UVC).

Radiațiile ultraviolete lungi sunt cuprinse între 3200 și 4000 Å și reprezintă cea mai mare parte a energiei UV, au cea mai mare putere de penetrație și au acțiune eritrogenă slabă.

Radiațiile ultraviolete medii sunt situate între 2900 și 3200 Å, ele pătrund până în stratul papilar al dermului producând vasodilatație și edem, din care cauză sunt cele mai eritrogene, cu maximum de efect la 2967 Å. Aceste radiații au un rol important în sinteza vitaminei D și în acțiunea oncogenă.

Radiațiile ultraviolete scurte sunt situate sub 2900 Å. Practic, ele nu se găsesc în radiațiile solare de la suprafața pământului, fiind absorbite de ozonul din straturile înalte ale atmosferei.

Radiațiile ultraviolete pot fi produse prin descărcări electrice în gaze, arcuri electrice etc. Soarele constituie o sursă puternică de radiații ultraviolete, care ajung pe pământ foarte atenuate datorită absorbției din atmosferă. Radiațiile ultraviolete provoacă efecte de natură fizică (ionizări etc.), chimică (reacții fotochimice) și biologică (degradarea țesuturilor sau a microorganismelor).

Microundele sunt unde electromagnetice, neionizante, cu lungimea de undă intermediară între infraroșu și undele de radiodifuziune. Termenul de microunde provine din faptul că aceste unde au o lungime de undă mult mai scurtă decât cele din banda VHF, utilizate pentru radare în timpul celui de al doilea război mondial.

Microundele au o lungime de undă aproximativ în gama de 30 cm la 1 mm, totuși, limitele între infraroșii îndepărtate, microunde și undele radio UHF sunt destul de arbitrare și variază după câmpul de studiu.

Microundele pot fi periculoase pentru sănătate datorită poluării electromag-

netice la o anumită putere, frecvență și durată de expunere. Influența acestui fenomen asupra sănătății este încă insuficient cunoscut și rămâne subiect de controversă.

Radiațiile infraroșii (IR) sunt radiații electromagnetice, neionizante, cu lungimi de undă superioare celor a luminii vizibile, dar mai scurte decât a microundelor.

Lungimea undelor infraroșii este cuprinsă între 700nm și 1mm. Infraroșiile sunt subdivizate în infraroșii apropiate (0,7–5μm), infraroșii medii (5–30μm) și infraroșii îndepărtate (30–1000μm).

Infraroșiile sunt asociate cu căldura deoarece, la temperatură normală, obiectele emit spontan radiații în domeniul infraroșiiilor, relația exactă fiind dată de legea radiațiilor corpului negru.

Având lungimi de undă mai mari decât a radiațiilor vizibile, infraroșiile pătrund mai ușor prin atmosferă și permit obținerea de fotografii clare a obiectelor îndepărtate. Infraroșiile au variate aplicații în tehnică.

Efectele biologice a radiațiilor depind de lungimea de undă, de frecvență, de intensitatea emisiunii continue sau pulsate și de durată. Pentru radiațiile optice, ochii și apoi pielea sunt cele mai vulnerabile la expuneri puternice.

Lumina albastră are un maximum de efect nefast asupra ochilor la 440 nm, iar în ultraviolet la 270 nm este un maximum de efect biologic asupra pielii.

Efectele asupra ochilor sunt diferite: asupra corneii (inflamație, arsuri), asupra cristalinului (cataractă, rană termică) și asupra retinei (disconfort, infla-

mație, rană termică), degradarea vederii de noapte și a culorilor datorită excesului de lumină etc.

Pentru pielea expusă la radiațiile optice, principalele efecte sau fenomene posibile sunt accelerarea îmbătrânirii pielii, pigmentarea, înroșirea, inflamarea, producerea diverselor tipuri de cancer etc.

Pentru toate radiațiile, altele decât cele optice, cunoașterea efectelor pe termen lung nu sunt concludente.

Pe termen scurt, efectele pot fi, după intensitatea și frecvența radiațiilor, creșterea temperaturii sau inducția curenților electrici în corp, șocuri care pot, câte odată, să meargă până la durere.

12.13.2. EFECTELE RADIAȚIILOR IONIZANTE ASUPRA COLAGENULUI

Radiațiile ionizante produc asupra colagenului efecte fizico-chimice și metabolice.

Iradierea cu raze X a unor preparate de colagen extras din tendonul cozii de șobolan au determinat modificări ale unghiului mic de difracție cu raze X. Astfel de modificări ale structurii colagenului supus iradierii se poate pune în evidență prin cercetarea temperaturii de contracție.

Bailey și colab. au arătat că iradierea colagenului, cu intensități progresive, produce o descreștere continuă a temperaturii de contracție. Au loc ruperi de legături de hidrogen intra- și intermoleculare [162, 249].

Piez și Gross [250] consideră că scăderea temperaturii de contracție a colagenului iradiat pare să depindă de restricția sterică impusă de structura secundară a lanțurilor polipeptidice colagenice. Este posibil, ca în afara ruperii de legături de hidrogen, să aibă loc și ruperi de legături covalente, dezorganizarea structurii favorizată și de pătrunderea cu mai mare ușurință a apei.

Ca urmare a iradierii, elasticitatea fibrelor de colagen scade. Tratarea fibrelor cu aldehide (aldehidă formică, aldehidă glutarică) înaintea iradierii, are ca efect o protecție a integrității structurale a colagenului [251].

Iradierea soluțiilor de colagen conduce la creșterea opacității lor, care se explică prin formarea de legături transversale; la doze de radiații foarte mari

structura colagenică își pierde elasticitatea și devine fragilă din cauza formării unei rețele rigide.

Iradieră soluțiilor de colagen cu doze crescînde, în absența oxigenului, conduce la creșterea vâscozității intrinseci, care se explică printr-un proces de agregare, în timp ce prezența oxigenului provoacă scăderea vâscozității intrinseci.

Dancewicz și Majewska, consideră că iradierea soluției acide de colagen, în absența oxigenului, conduce la o creștere, dependentă de doză, a numărului de fracțiuni γ (agregate formate din trei lanțuri polipeptidice unite prin legături covalente) și de agregate colagenice cu greutate moleculară mare [252].

La doze mari de radiații, crește conținutul de agregate colagenice cu greutate moleculară mare. Această creștere este însoțită de scăderea simultană a conținutului în fracțiuni α (un lanț polipeptidic) și β (agregate de două lanțuri polipeptidice unite prin legături covalente).

Iradieră colagenului în prezența oxigenului are ca efect o modificare, dependentă de doză, a compoziției subunităților de colagen, remarcându-se o creștere a fracțiunilor grele.

Efectele radiațiilor ionizante asupra metabolismului colagenului, ca și semnificația lor biologică imediată și tardivă, reprezintă domenii largi pentru cercetare.

Mazanowska și Dancewicz au arătat că degradarea colagenului într-un organism iradiat se datorește faptului că acesta devine mult mai susceptibil acțiunii collagenazei și a altor proteaze nespecifice având drept consecință o intensificare a degradării sale [253].

La animalele iradiate experimental și, în unele cazuri de iradierii accidentale la oameni, au fost puse în evidență două fenomene metabolice: o creștere a excreției de hidroxiprolină și de acid pirol-2-carboxilic, precum și o sporire a ratei de transformare a colagenului solubil în colagen insolubil.

Colagenul solubil din piele, oase și mușchi, la o iradiere totală a unui animal, este degradat, iar conversia formei solubile în formă insolubilă este inhibată [254].

Iradieră animalelor tinere provoacă îngreunarea reînnoirii condroblastelor, arhitectura plăcii epifizale este distrusă, mineralizarea oaselor este afectată [162].

În mușchiul iradiat, colagenul solubil crește pe seama fracțiunii insolubile, care este de fapt un viciu în conversia formei solubile [162].

Pickerell J.A., Dorothy V., Marris F. [255], au iradiat un hamster și au constatat creșterea cantitativă a fracțiunii de colagen solubil pulmonar.

Analizând efectele radiațiilor asupra metabolismului colagenului, rezultatele conduc la concluzia că rata transformării colagenului solubil în colagen insolubil este mai mare la animalele iradiate.

12.13.3. EFECTELE RADIAȚIILOR ULTRA VIOLETE ASUPRA COLAGENULUI

Efectele biologice a ultravioletelor asupra tegumentelor se produc în funcție de cantitatea și lungimea lor de undă.

Modificările patologice produse de radiațiile solare asupra tegumentelor se numesc fotodermatoze și unele dintre acestea pot fi produse și de alte surse luminoase [256]. Au loc o serie de reacții fotochimice produse de radiațiile cu lungime de undă mică și reacții calorice produse de radiațiile cu lungime de undă mare.

Energia radiantă absorbită de către piele poate produce căldură, ionizări, disocierea sau excitarea moleculelor cu formare de radicali liberi, care sunt molecule active din punct de vedere chimic și influențează unele procese biologice ale organismului [257, 258, 259].

Termenul științific pentru radicalii liberi este specia de reactiv oxigenat, cu prescurtarea în limba engleză de ROS sau RONS. În mare, radicalii liberi sunt specii chimice de foarte mare reactivitate, capabili de a oxida proteinele, ADN și membranele celulare (lipidele).

Exemple de radicali liberi: radicalul super-oxid ($O_3^{\cdot}$); radicalul hidroxil ($OH^{\cdot}$); radicalii peroxid ($ROO^{\cdot}$), radicalul alcóxil ($RO^{\cdot}$) unde R este un lanț carbonat; radicali care derivă de la acizi grași ne-saturați; peroxinitritul ($ONOO^{\cdot}$); monoxidul de azot ($NO^{\cdot}$).

Radicalii liberi au un rol important la îmbătrânirea pielii și în producerea multor îmbolnăviri inflamatorii și cancere ale pielii. Radicalii liberi sunt implicați în vătămarea celulelor epiteliale cu UV și radiații ionizante.

Printre mijloacele de apărare a pielii împotriva radicalilor liberi sunt o serie de antioxidanți. Sunt antioxidanți solubili în grăsimi, ca vitamina E și carotinoidele, antioxidanți solubili în apă, ca vitamina C și glutatiunea și enzimele superoxid dismutaza, catalaza, glutatiun reductaza și glutatiun peroxidaza [260, 261, 262]. Acești antioxidanți îndepărtează radicalii liberi și contracarează efectele potențialului lor de vătămare [263, 264, 265, 266, 267].

Vitamina E are un rol esențial în protecția membranei tuturor celulelor organismului. Ea este un antioxidant, adică contribuie la neutralizarea radicalilor liberi din organism și, mai mult, ea împiedică sau reduce oxidarea lipoproteinelor de slabă densitate (LDL). Această oxidare a LDL este asociată cu apariția aterosclerozei și deci maladii cardiovasculare.

Vitamina C este un nutrient esențial vieții, solubil în apă, implicat în producția de glucocorticosteroizi și de anumiți neurotransmițători (substanțe care permit transmiterea influxului nervos), în metabolismul glucozei, al colagenului, al acidului folic și a anumitor aminoacizi, în neutralizarea radicalilor liberi și a nitrozaminelor, în reacții imunologice, care facilitează absorbția fierului la nivelul tubului digestiv.

Mai recent, s-a constatat că o combinație sinergetică construită din vitaminele A, C și E este mult mai eficientă decât doar vitaminele E sau C sau A luate separat. De asemenea, ascorbatul de calciu este mult mai eficient decât acidul ascorbic (vitamina C) deoarece, este ușor absorbabil, nu are acțiune vătămătoare asupra mucoasei stomacale și intestinale și aduce, în plus, un aport de calciu în organism [268, 269, 270, 271].

Sunt unii antioxidanți care acționează mai puternic în zona unor organe, ca de exemplu, coenzima Q₁₀ pentru inimă și sistemul circulator, catehinele din extractul de ceai verde, cu spectru larg și, mai ales, pentru sistemul imunitar, bioflavonoizii (Rutina, Quercitina, Bioflavonoizii citrici) au acțiune în special în zona sistemului circular periferic.

Sistemul imunitar este un complex de mecanisme care reglează neîntrerupt starea noastră de sănătate și ne apără continuu împotriva a numeroase influențe ostile. Elementele sistemului imunitar se extind până la nivelul tuturor organelor și țesuturilor.

Rolul sistemului imunitar este acela de a identifica și elimina orice agresiune internă și externă, de a distinge perfect între ceea ce este propriu organismului și ceea ce îi este străin și de a acționa în consecință.

Față de orice traumă, corp străin, toxină, lipsă totală de oxigen, etc., reacția inițială a sistemului imunitar este de inflamație (imunitate nespecifică). Urmează un protocol de autoapărare specializat în funcție de agentul agresor (imunitate specifică), manifestându-se la nivel celular (tipuri specializate de celule albe sau leucocite care fie absorb direct digerând, fie distrug agenții patogeni sau celulele interne degenerate) și molecular (anticorpi care se găsesc în sânge și care se atașează corpilor străini escortându-i spre organele de eliminare).

Sistemul limfatic include componente esențiale ale sistemului de apărare. Există o rețea vastă de vase limfatice cu misiunea de a drena deșeurile și reziduurile deversate din celulele organismului.

Leucocitele au rol de apărare a organismului. Toate tipurile de celule imunitare se numesc în ansamblu leucocite. Misiunea lor este de a distruge, otrăvi, digera sau neutraliza orice inamic. Când sunt mobilizate, unele acționează imediat, altele chiar după câteva luni, sau abia în final (cap.2.4.7. Vol.I).

Organismul uman este neîntrerupt asaltat de viruși, bacterii, ciuperci, toxine etc., dar numai când sistemul imunitar slăbește sau nu mai face față agresiunilor apar bolile. Prin urmare, păstrarea sau recuperarea stării de sănătate depinde, în cea mai mare măsură, de buna funcționare a sistemului imunitar.

Răspunsul imun reprezintă un ansamblu de modalități de reacție specifice ale unui organism sau a unui anumit sistem celular, declanșate la contactul cu o substanță străină introdusă în interiorul acestuia. Răspunsul imun are înțelesul de producere de anticorpi specifici față de un anumit corp străin denumit *antigen*, generator de reacții îndreptate împotriva sa însuși (anticorpii).

La acțiuni intense a energiei radiante procesele fotochimice pot deveni patologice. Modificările care apar la nivelul pielii sub acțiunea UV sunt multiple:

morfologice, biochimice, histopatologice etc.; ele pot produce o îmbătrânire precoce a pielii și transformări maligne. Ca manifestări ce pot avea loc la acțiuni mai intense a radiațiilor UV asupra pielii sunt: pigmentarea, eritemul, hiper-keratoza, cancerul cutanat.

Sub acțiunea îndelungată a radiațiilor solare se produc, la nivelul tegumentelor, alterări degenerative dermoepidermice, care pot duce la o stare sclero-atrofică premergătoare apariției unor leziuni precanceroase și canceroase [272].

Histologic, se constată atrofii ale epidermului, degenerescența bazofilă a țesutului conjunctiv de la nivelul dermului și o îngroșare a pereților vasculari cu diminuarea lumenului [272]. Modificările histopatologice ale tegumentelor iradiate cu UV, sunt în funcție de lungimea de undă, durata și intensitatea iradierii. În zonele tegumentelor suprasolicitate de radiațiile UV se remarcă o creștere a mucopolizaharidelor la nivelul celulelor spinoase, bazale, a membranei bazale, a fibrelor colagenice, a vaselor sanguine. În derm se constată modificări ale colagenului și alterări vasculare moderate.

Radiațiile UV au o mică putere de penetrație, din care cauză acțiunea lor produce modificări patologice în primul rând la nivelul tegumentelor. Dar în condiții severe pot produce modificări la nivelul întregului organism [272].

R.L.Davidson și D.R.Cooper au cercetat efectul radiațiilor UV asupra colagenului solubil acid și în soluții de săruri neutre din pielea de vițel, cu privire la schimbările conformaționale ale colagenului denaturat termic. Prin iradierea cu UV a soluțiilor de colagen denaturat termic, se constată o creștere a vâscozității soluțiilor.

Cercetătorii au ajuns la concluzia că, prin iradiere cu UV au loc scindări ale structurii primare a lanțurilor polipeptidice și o dezordonare a structurii terțiare [273].

Îmbătrânirea pielii este influențată de mulți factori: genetici, de mediu înconjurător (iradiere cu UV, xenobiotici, stres mecanic), schimbări hormonale, procese metabolice (generarea de compuși chimici reactivi ca zaharuri, aldehide etc.).

Influența mediului înconjurător și, mai ales, a radiațiilor UV au o importanță considerabilă asupra îmbătrânirii pielii.

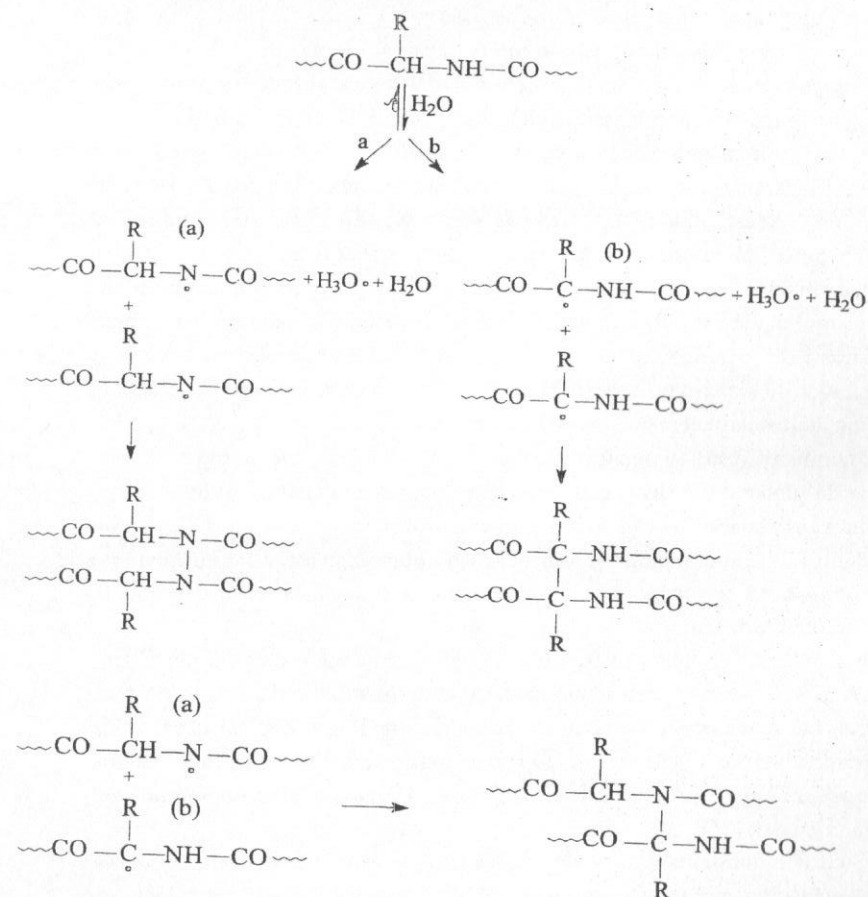


Fig.12.62. Reticulări ale colagenului prin mecanism radicalic

Studiile histologice și ultrastructurale au scos în evidență faptul că vătămarea pielii din cauza radiațiilor UV este asociată cu creșterea grosimii epidermului și alterarea organizării țesutului conjunctiv.

Radiațiile UV care produc așa-zisa fotoîmbătrânire a pielii au o contribuție însemnată la deteriorarea organizării fibrilare a colagenului și la acumularea elastinei la joncțiunea epiderm-derm [273, 274].

Responsabile, în parte, pentru vătămarea determinată de iradierea cu UV sunt metaloproteinazele matriciale (MMP). Împreună, collagenaza interstițială sau collagenaza 1 (MMP-1), stromelizina 1 (MMP-3 și gelatinaza B (MMP-9) au capacitatea de a degrada colagenul fibrilar matur din piele. În afară de pricinuirea descompunerii colagenului, iradierea UV deteriorează și colagenul de tip I recent sintetizat.

Iradierea UV duce, deci, la descreșterea producerii colagenului și deteriorarea organizării fibrililor din piele *in vivo* [276].

Colagenul nativ extractibil, eucolagenul, fibrele de collagen, gelatina, supuse iradierii cu diverse tipuri de radiații (raze X, raze γ , raze ultraviolete), suferă reticulări pe baza unui mecanism radicalic. Un exemplu de mecanism radicalic la care au acționat radiațiile ultraviolete de joasă energie ($\lambda = 254$ nm) produse de o lampă cu mercur este redat în figura 12.62.

Intensitatea reticulărilor este influențată de natura materialului colagenic, de durata și de temperatura de expunere la radiații. Creșterea duratei de iradiere duce la mărirea intensității de reticulare [205].

12.14. ELEMENTE DE PATOGENEZĂ ALE COLAGENULUI

Colagenozele, "boli ale colagenului", nu sunt considerate entități morbide, ci, mai degrabă, modalități diferite de reacție la cauze diverse, toxice sau microbiene.

Deficitul alimentar în vitamină C cauzează *scorbutul*, o boală gravă și dureroasă, în care colagenul sintetizat anormal împiedică formarea unui țesut conjunctiv puternic, duce la gingivite, pielea se decolorează, apar pe corp plăgi nevindecabile.

În corpul uman, funcționarea necorespunzătoare a sistemului imunitar, numită boala autoimună, rezultă în răspunsul imun în care fibrele sănătoase de collagen sunt sistematic distruse, împreună cu inflamarea țesutului înconjurător. Simptomul este numit *Lupus eritematos* și *artrita reu-*

matoidă sau bolile țesutului colagenic. Multe bacterii și viruși sunt factori agresivi care distrug colagenul sau stânjenesc combinațiile sale.

S-a arătat că scorbutul se datorește deficitului în vitamina C, care duce la forme grave de degradări și purulențe ale gingiilor, la hemoragii, apoi la moarte. Vitamina C este un precursor al coenzimei enzimei implicate în *hidroxilarea colagenului* în procesul său de sinteză. Hidroxilarea este indispensabilă la formarea triplului helix și apoi la constituirea structurii cuaternare a colagenului (subcap. 12.2.1.).

Rana deschisă se produce în urma unui tip fizic de traumă a pielii prin sfășiere, tăiere sau înțepare sau rană închisă sau contuzie. În patologie formele de vătămare specifice se referă la daunele aduse dermului pielii.

Lupus eritematos diseminat este o boală sistemică, a țesutului conjunctiv, prin alterări degenerativ-progresive ale țesutului conjunctiv-colagen și se manifestă în mod diferit la diverși indivizi.

Se manifestă asupra articulațiilor, mușchilor, au loc manifestări cutanate, renale, inflamații la nivelul plămânilor sau a inimii, manifestări neurologice, se produc unele probleme sanguine, febră. Aceste manifestări sunt însoțite de oboseală latentă sau trecătoare, slăbiciune, iritare.

Lupus eritematos diseminat este, în principal, o boală autoimună: anticorpii specifici sunt produși de sistemul imunitar al individului bolnav. Moleculele recunoscute în mod anormal ca străine sunt rezultatul nucleozomilor, a spliceozomilor (numite particule de episaj sunt forme de $RNP_{sn} + ARN_{pre-mesager}$) și a compuşilor ribonucleoproteici citoplasmatici.

Aceste entități celulare sunt prezente la aproape toate celulele și, în consecință, sunt susceptibile de a fi detectate când o celulă este vizată. Aceasta conduce la distrugerea altor celule vecine, provocând astfel simptome ale bolii.

Primele accese ale bolii apar adesea după un stres, sarcină (la femei), administrarea unor medicamente, expunere la radiația solară. În realitate, aceste evenimente scot în evidență boala deja existentă. Boala se manifestă prin dureri reumatismale, artite, manifestări cutanate, neurologice, respiratorii, digestive, renale, vasculare etc.

Sub numele de *parapsoriasis*, se întâlnesc trei tipuri eruptive rare, cu evoluție cronică și cu totul independente de psoriazis cu care nu prezintă decât vagi asemănări clinice: *pitirizis rubra*, *lichenul plan* și *lichenul nitidus*.

Pitirizis rubra este o dermatoză rară, cu evoluție cronică și cu sfârșit de cele mai multe ori letal.

Lichenul plan, o dermatoză cronică, caracterizată din punct de vedere clinic printr-o erupție pruriginoasă, mai mult sau mai puțin întinsă, constituită din papule de aspect particular.

Lichenul nitidus este o dermatoză rară, foarte asemănătoare, din punct de vedere clinic, cu leziunile elementare ale lichenului plan, dar deosebindu-se prin structura lor tuberculoidă. El se prezintă sub forma unei erupții localizate pe anumite părți ale corpului.

12.15. ÎMBĂTRÂNIREA COLAGENULUI

12.15.1. CONSIDERAȚII GENERALE

Îmbătrânirea organismului afectează procesele metabolice de bază ale parenchimurilor și țesuturilor, modificând funcțiile celulelor și diminuând eficiența mecanismelor homeostazice. În general, aceste alterări se reflectă în scăderea rezistenței organismului față de diferiți factori de mediu. Cercetările privind mecanismul îmbătrânirii țesutului conjunctiv arată rolul, de mare importanță, a transformărilor care au loc la nivel macromolecular în acest proces.

În biologie, îmbătrânirea este un proces fiziologic care antrenează modificările progresive din cursul vieții. Îmbătrânirea unui organism începe după faza maturității.

Ontogeneza sau anatomia dezvoltării, cuprinde studiul dezvoltării omului de la formarea oului până la dispariția sa prin moarte naturală, la împlinirea vârstei bătrâneții avansate. Moarte „naturală” aproape că nu există sau se întâmplă foarte rar. De obicei intervin boli care pun capăt zilelor individului.

Gerontologia, studiul fenomenelor de îmbătrânire, urmărește modificările morfologice și funcționale ce survin în organismul uman odată cu înaintarea în vârstă.

Manifestările biologice caracteristice procesului de îmbătrânire depind de acțiunea conjugată a caracterelor ereditare ale individului cu cele ale mediului înconjurător.

Îmbătrânirea conduce la diminuarea funcțiilor organismului, ca de exemplu: forța musculară, viteza de conducere a influxului nervos prin nervi, capacitatea filtrantă a rinichiului, volum-minutul inimii și, în general, a tuturor parametrilor fiziologici. Toate funcțiile fiziologice decad odată atins nivelul funcțional maxim, în fiecare an cu 0,5–1,3% [277].

Bătrânețea este o perioadă de regresie a structurilor și a funcțiilor organismului uman.

Morfologic, înaintarea în vârstă se manifestă, în mod obișnuit, printr-o atrofiere progresivă și scleroză a diferitelor organe, modificări la nivel celular și intracelular. O ipoteză aflată în atenția cercetării științifice este aceea că îmbătrânirea ar putea fi cauzată de anumite *alterații programate genetic*.

Procesul de îmbătrânire duce la micșorarea potențialelor energetice și de sinteză și, în special, a proceselor de sinteză a acizilor nucleici și a proteinelor, care influențează scăderea capacității de autoreînnoire a materiei vii.

Capacitatea funcțională și valoarea diferitelor sisteme enzimatic se modifică în procesul de îmbătrânire, în sensul unei scăderi a activității acestora, în-deosebi a enzimelor proteolitice și a ribonucleazei din diferitele țesuturi și organe. Cu creșterea vârstei, țesutul conjunctiv prezintă o scădere progresivă a numărului elementelor celulare, concomitent cu creșterea cantității de fibre colagene, care apar îngroșate și cu structură modificată.

Au loc importante modificări: scăderea elasticității, creșterea rigidității, scăderea solubilității în soluții de acizi slabi sau de săruri neutre, creșterea rezistenței față de digestia cu colagenază.

Toate aceste constatări sunt rezultatul unor determinări *in vitro*.

Concomitent, sunt *modificări osoase* (scăderea metabolismului țesuturilor osoase, densificări sau poroze) și articulare (calcifieri, deformări articulare, sinostoze) și, de multe ori, o creștere a cantității de țesut adipos, inclusiv în interstițiul unor organe.

Cu creșterea vârstei au loc modificări de metabolism.

Astfel, hidratații de carbon, respectiv glicemia crește cu vârsta.

Bătrânii se pare că tolerează mai greu ingestia grăsimilor. Moleculele de fosfolipide ale reticulului endoplasmatic sunt înlocuite treptat de colesterol.

În stratul lamelar hidrofob al membranei există un complex fosfolipidocolesterol format prin interacțiunea colesterolului cu lanțurile hidrocarbonate ale fosfolipidelor. La îmbătrânire, apar dereglări în structura și proprietățile fizico-chimice ale proteinelor. Această afirmație o dovedește și asocierea colagenului, elastinei și a mucopolizaharidelor în scleroza țesutului conjunctiv.

Prin îmbătrânire, colagenul insolubil crește cantitativ, se formează noi legături covalente.

12.15.2. MODIFICĂRI ALE COLAGENULUI ÎN PROCESUL DE ÎMBĂTRÂNIRE

În procesul de îmbătrânire a macromoleculei de colagen, are loc o creștere a numărului legăturilor intermoleculare ca urmare a unor modificări metabolice de lungă durată.

Creșterea numărului de legături intermoleculare mărește densitatea stării solide, produce reducerea spațiului dintre lanțurile polipeptidice, dintre molecule, precum și blocarea reactivității grupărilor implicate în aceste legături. Are loc o scădere a volumului specific, a capacității de hidratare, a reactivității chimice și o creștere a rezistenței mecanice [12].

Cea mai utilizată metodă de testare a vârstei *bictogice* a fibrelor collagenice este contracția termică.

S-a constatat, de exemplu, că la încălzirea unui fragment de tendon la temperatura de 58°C, acesta se scurtează cu aproximativ 1/4% din lungimea inițială, devine translucid, cu o elasticitate asemănătoare cauciucului vulcanizat, iar moleculele de colagen își pierd starea helicoidală a lanțurilor sale polipeptidice. În funcție de temperatură și de timpul de expunere, pentru același tip de fibre, s-a putut analiza forța contracției, care pare să crească proporțional cu numărul legăturilor intermoleculare [12].

Metoda cea mai utilizată pentru această analiză o constituie atârănarea unor greutateți la capătul liber al fragmentului de tendon și urmărirea intensității con-

tracției în raport cu valoarea greutateții. Mărirea greutateții, care poate bloca contracția termică, variază cu vârsta biologică.

Pentru creșterea numărului de legături intermoleculare, în fibrele de colagen, s-a cercetat posibilitatea găsirii, în condiții fiziologice, a unor astfel de agenți și s-a constatat că aldehydele alifaticе, *in vitro* pot să realizeze astfel de interconectări. În practica tăbăcirii pieilor, aldehida formică și aldehida glutarică au aplicații de mult timp, dar și chinonele (benzochinona) pot produce astfel de legături, chiar mai rezistente decât a aldehydelor alifaticе.

Ca agenți potențiali de îmbătrânire a moleculelor din fibrele de colagen sunt aldehida glicerică și aldehida piruvică din metabolismul glucidic, aldehida glicolică din metabolismul protidic, acroleina și aldehida crotonică din metabolismul lipidic [12, 278].

Studii asupra mecanismului producerii legăturilor transversale au evidențiat apariția, mai întâi, a unui derivat aminometilol ($-NH-CH_2-OH$) al aminelor primare și secundare. Se creează, deci, o grupă OH foarte reactivă, aptă să reacționeze cu o altă grupă care conține un atom de hidrogen activ. Se elimină o moleculă de apă și ia naștere o punte metilenică ($R-NH-CH_2-NH-R'$), rezistentă la acțiunea agenților chimici, a enzimelor și a căldurii.

Dialdehidele pot forma punți transversale prin legături metilenice sau baze Schiff la ambele capete ale moleculei.

Grupele cele mai reactive ale colagenului pentru reacțiile cu aldehydele sunt cele ε-aminice de la lizină și ceto-imidice. Sunt implicate, de asemenea, grupa ε-aminică a hidroxilizinei, grupele amidice de la asparagină și glutamină, grupa guanidinică de la arginină și grupa hidroxilică a hidroxiprolinei.

Interconectarea moleculelor de colagen contribuie la procesul de deshidratare a fibrelor de colagen și de elastină.

Îmbătrânirea colagenului se poate datora și unor modificări structurale ce au loc în macromolecula de colagen, determinate de tendința de retracție în direcția energiei libere minime [12, 279].

Retracția are loc prin mărirea cristalinității în zonele bogate în aminoacizi apolari din macromolecula de colagen. Astfel, la embrionul de șobolan macromoleculele de colagen sunt cristaline în proporție de 9,1%, iar la anima-

lul adult cristalinitatea crește la 18,1% [12, 279].

În cursul acestui proces de retracție, are loc apropierea grupelor reactive ale lanțurilor polipeptidice care permite interconectarea lor directă, rezultând noi legături intermoleculare, eliminarea apei dintre lanțurile polipeptidice care se apropie și creșterea rigidității macromoleculei.

Apropierea grupelor reactive ale lanțurilor polipeptidice din două macromolecule de colagen face ca parametrii termodinamici să fie favorabili, mai ales, pentru formarea legăturilor de hidrogen, care necesită o energie liberă de aproximativ 0,6 kcal/mol la 27°C [280].

S-a arătat că testul de contracție termică a fibrelor de colagen, care evidențiază densitatea legăturilor intermoleculare, are valori tot mai ridicate, pe măsură ce fibrele colagenice provin de la un organism mai bătrân. Acest proces poate fi explicat prin acțiunea agenților proveniți din metabolismul intermediar, cât și prin formarea de noi punți de hidrogen, prin creșterea gradului de cristalinitate al macromoleculelor.

În condițiile apropierii tot mai strânse a lanțurilor polipeptidice, în cursul procesului de retracție termodinamică, are loc evacuarea unor molecule de apă, iar grupele N-H și C=O ale moleculei de colagen, care formau punți de hidrogen cu moleculele de apă rămân libere.

Dacă lanțurile polipeptidice se apropie sub 5Å, aceste grupe formează punți de hidrogen de la un lanț la altul, mărind astfel densitatea legăturilor intermoleculare.

Creșterea rigidității moleculelor de colagen, ca urmare a retracției termodinamice, este rezultatul măririi gradului de cristalinitate în zona moleculei de colagen dominată de aminoacizii apolari.

Deficitul de magneziu constituie un factor de risc pentru îmbătrânire. Deficitul de magneziu la oamenii mai în vârstă își are originea în două mecanisme etiologice: lipsa și epuizarea [281, 282, 283].

Lipsa magneziului este cauzată de insuficiența consumului de magneziu prin alimentație la întreaga populație. Epuizarea magneziului se datorește dereglării factorilor care controlează metabolismul.

Colagenul devine mai abundent și mai rigid cu vârsta, până la o anumită vârstă. Printre nutrienții care influențează metabolismul la colagen sunt vitaminele B₆ și E, care au interdependență cu magneziu [284, 285, 286].

Un alt factor important care este implicat în îmbătrânirea colagenului sunt iradiațiile despre care s-a tratat în subcapitolul 12.13.

12.15.3. ASPECTE PRIVIND ÎMBĂTRÂNIREA PIELII

Cu vârsta, se produc modificări ale țesutului conjunctiv din piele, semne ale îmbătrânirii organismului. Pielea se cutează, se subțiază, își pierde din elasticitate, îi crește vulnerabilitatea față de diferiți factori mecanici.

Îmbătrânirea pielii este rezultatul a două procese: îmbătrânirea proprie și cea externă sau fotoîmbătrânirea.

Îmbătrânirea proprie poate fi influențată genetic și este independentă de toate influențele mediului înconjurător. Fotoîmbătrânirea este provocată de radiațiile UV și alți agenți dăunători care accelerează modificările pielii [287, 288, 289, 290].

Cu vârsta, are loc o creștere a cantității de colagen din piele, evidențiată la om, până la vârsta de 70 de ani, după care se produce o diminuare netă, determinând subțierea pielii și apariția cutelor. Diminuarea colagenului din piele pare mai netă la femei în comparație cu bărbații de aceeași vârstă.

Odată cu îmbătrânirea, colagenul din piele devine progresiv mai greu solubil în soluții acide sau de săruri neutre.

Fracția insolubilă a colagenului (exprimată în mg/100 mg piele uscată și degresată) crește de la 63,7 la nou născut la 75,1 la adult [12] și, în aceeași perioadă, fracția solubilă scade de la 8,6 la nou născut la 3,1 la adult.

Cu creșterea vârstei se mărește numărul de legături intermoleculare, crește raportul cantitativ între monomerii α în favoarea fracțiunilor β și γ , colagenul suferă o anumită deshidratare, devine mai rigid și prezintă o mai mare rezistență mecanică. Pe plan macromolecular se evidențiază o creștere progresivă a cristalinității și o ridicare progresivă a temperaturii de contracție.

Zona unde se face trecerea de la fibrele nemature spre cele progresiv mai mature este situată sub epiderm. La acest nivel apare turnoverul cel mai activ,

iar spre dermul profund scade până la totală inerție metabolică a fibrelor [12]. Susceptibilitatea la digestia cu colagenază scade cu cât ne depărtăm de dermul superficial în direcția zonei profunde.

Scăderea cantității de colagen din piele, de la o anumită vârstă, s-a observat și la oase, cartilaje, tendoane. Este posibil ca acest proces să se producă ca urmare a eliberării enzimelor lizozomale din fibroblaști și printre aceste enzime să existe și unele cu efect colagenolitic [12].

Pielea expusă razelor solare îmbătrânește mult mai rapid și mai intens în comparație cu cea neexpusă.

La microscopul optic, pielea arsă de soare prezintă o așa numită basofilie a dermului, asociată cu un anumit grad de atrofie a fibrelor fucsinofile și cu creșterea numerică a unor structuri colorabile cu fucsină.

Pe baza acestor constatări s-a emis ipoteza că expunerea prelungită la soare din cursul vieții, ar fi cauza elastozei senile [12].

În afara alterării stabilității structurale apare diminuarea tirozinei, histidinei și fenilalaninei din macromolecula de colagen.

12.16. UTILIZĂRI ALE MATERIALELOR COLAGENICE

12.16.1. INTRODUCERE

Colagenul se găsește în stare naturală cu alți compuși la alcătuirea diferitelor țesuturi conjunctive și organe din corpul animalelor superioare, constituind așa-numitele compozite naturale (cap. 2.4. Vol.I).

Un *material compozit* este un ansamblu de cel puțin două substanțe diferite, între care trebuie să fie o diferență importantă de masă moleculară. Definirea se referă la un amestec de oligomeri cu polimeri sau la amestecuri de poli-meri.

Materialele compozite conțin cel puțin două materiale (două faze), care stau împreună, își păstrează identitatea și proprietățile, nu se dizolvă și nu fuzionează între ele. Materialele ce constituie compozitul păstrează între ele o interfață și acționează simultan, sinergetic, probând îmbunătățirea calităților specifice. Rezultă caracteristici de ansamblu care nu se regăsesc la componentele inițiale luate individual.

Cea mai nouă și de vârf posibilitate de utilizare a materialelor compozite este domeniul biomaterialelor. Un *biomaterial* este o substanță, alta decât un medicament sau o combinație de substanțe, de origine animală, vegetală sau sintetică, care poate fi folosită ca parte sau parte integrală a unui sistem care tratează, îmbunătățește sau înlocuiește un țesut, un organ sau o funcție a organismului. În biomaterialele compozite, fiecare component trebuie să fie biocompatibil.

Asimilarea biopolimerilor în scopuri medicale, ca înlocuitori ai organelor sau ca elemente de corecție, susținere sau intensificare a funcțiilor acestora, este motivată de constituția macromoleculară a suportului mecano-structural biologic.

Sistemele biologice sunt constituite din proteine, răspunzătoare de caracteristicile morfologice ale țesuturilor și organelor; proteine globulare; catalizatori ai proceselor metabolice; poliacizi nucleici, care controlează biosinteza proteinelor prin codificarea, conservarea și transmiterea informației genetice; zaharuri și lipide implicate în schimburile energetice; apă și electroliți.

În general, materialele care alcătuiesc compozitele naturale (biocompozitele) pot fi grupate în cinci categorii: proteine, polizaharide, lipide, ceruri, minerale și apă.

Prelucrarea materialelor colagenice cu polimeri în vederea obținerii materialelor compozite colagenice, conferă colagenelor proprietăți pe care le posedă numai materialele polimere necolagenice, de asemenea, se obțin și proprietăți noi, pe care nu le posedă colagenul și nici polimerii necolagenici.

Obținerea compozitelor colagenice se realizează pe cale umedă și uscată.

În procedeul umed se amestecă o soluție sau dispersie solid-lichid de material colagenic cu o soluție sau dispersie solid-lichid de polimer necolagenic, rezultând un fluid compozit, care poate fi prelucrat în continuare în vederea obținerii unui compozit în stare de gel sau solidă.

În procedeul uscat se amestecă un solid colagenic cu un polimer necolagenic în stare înalt elastică sau fluid-vâscoasă și rezultă un compozit cu proprietăți de curgere limitate de unele condiții (temperatură și viteză de forfecare).

Materialele colagenice se obțin din țesuturile conjunctive care nu au suferit modificări chimice sau enzimatică anterioare sau care au fost supuse, în prealabil, unor tratamente chimice sau enzimatică. Având în vedere spectrul larg de utilizare a materialelor colagenice (biomateriale, materiale alimentare și zootehnice, materiale pentru industria pielăriei etc.) ambele categorii au importanță practică.

Materialul colagenic care nu a suferit modificări chimice anterioare se găsește în țesuturile conjunctive încă în stare nereticulată, sub formă de macromolecule de collagen sau asociate de macromolecule colagenice, care este solubil în soluții diluate de săruri neutre sau în soluții diluate de acizi. Astfel de materiale colagenice pot fi purificate destul de avansat și se folosesc pentru obținerea unor biomateriale și în cercetarea științifică [242, 290, 291].

Materialele colagenice care au suferit modificări chimice anterioare se obțin din collagenul insolubil sub formă de collagen solubilizat, gel sau pastă de collagen și hidrolizat de collagen [292, 293, 294, 295].

Resursa de materie primă cea mai importantă cantitativ pentru producerea materialelor colagenice, în vederea utilizării lor ca biomateriale, materiale alimentare și zootehnice, auxiliari pentru prelucrarea pieilor, materiale pentru protecția mediului etc., o reprezintă pielea animală și deșeurile de piele.

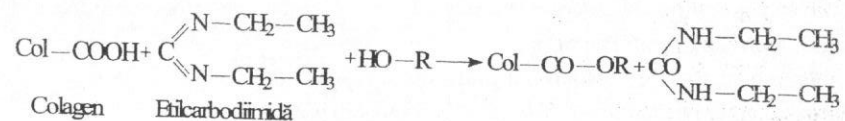
În scopul diversificării utilizării materialelor colagenice, acestea pot fi supuse unor tratamente chimice, care le fac mai compatibile.

În aceste tratamente pot fi implicate grupe funcționale ale resturilor de aminoacizi (*reacții polimer-analoage*), se pot *grefta* la molecula de collagen unii oligomeri sau se pot produce *reticulări*, pentru a se forma sau a se accentua structura tridimensională.

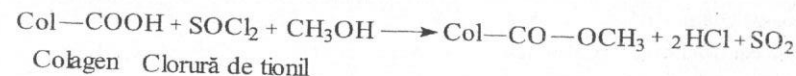
În urma reacțiilor polimer-analoage, la contactul unui material colagenic cu un agent micromolecular, se poate produce blocarea diferitelor grupe reactive ale collagenului ($-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$ etc.) sau se pot atașa noi grupe aminice, carboxilice, hidroxicale sau alte grupe funcționale.

Reacțiile polimer-analoage la grupa carboxilică pot fi realizate pe diverse căi [242, 296, 297, 298, 299].

Metoda mai frecvent utilizată este cea cu derivați de carbodiimidă:

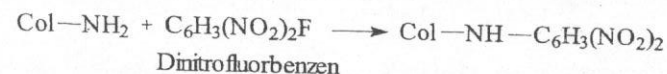


Se menționează, de asemenea, esterificarea grupei carboxilice cu clorură de tionil și alcool metilic sau etilic anhidri:

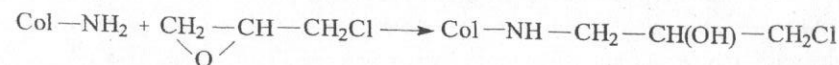


Transformările polimer-analoage la grupa aminică se fac, mai ales, cu derivați halogenați, epoxizi, izocianați, cloruri acide și anhidride.

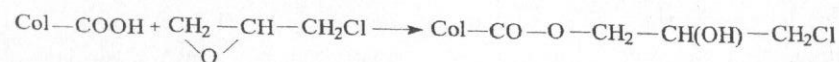
Dintre derivații halogenați, cei mai folosiți sunt clorura de benzil, bromura de benzil, diclorfenilmetanul, dinitrofluorbenzenul [300, 301]:



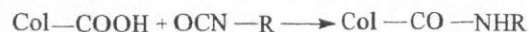
Pentru epoxizi se exemplifică reacția collagenului cu epiclorhidrina:



Epoxizii reacționează și cu grupele carboxilice ale collagenului:



Izocianații reacționează cu grupele aminice, carboxilice și hidroxicale ale collagenului:

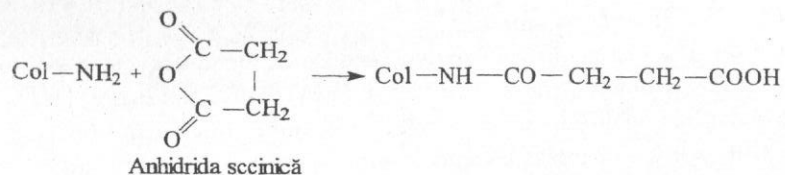
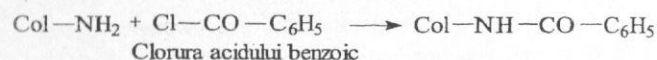


Clorurile acide și anhidridele dau reacții polimer-analoage cu grupele amine și hidroxilice ale colagenului [302, 303, 304, 305, 306, 307].

Clorurile acide au acțiune de blocare a grupelor aminice și, în funcție de intensitatea reacțiilor, modifică pH-ul izoelectric și, implicit, reactivitatea colagenului prin intermediul grupelor carboxilice. Dintre anhidride, anhidrida ftalică, anhidrida succinică și anhidrida maleică prezintă cea mai mare importanță practică.

Transformarea chimică a materialelor colagenice prin grefare, pe baza unui chimism radicalic, se realizează la tratarea cu monomeri; are loc inițierea reacțiilor și apoi polimerizarea monomerilor. Monomerii folosiți frecvent la grefarea materialelor colagenice sunt: monomerii acrilici, vinilici, dienici, anhidride alilice, N-carboxi-anhidride, lactame și lactone.

Reticularea materialelor colagenice prezintă o mare varietate de aspecte în funcție de natura materialului și necesitățile în vederea folosirii lui.



12.16.2. GENERALITĂȚI PRIVIND PRELUCRAREA PIEILOR

Pielele animalelor domestice, de vânat, a reptilelor, ale animalelor marine și peștilor reprezintă materia primă a industriei de pielărie și blănărie, din care se fabrică o mare varietate de piei finite pentru încălțăminte, îmbrăcăminte, marochinărie, mănuși și articole tehnice cu diverse utilizări.

În urma transformării pieilor brute în piei finite și apoi în articole confecționate, rezultă o cantitate însemnată de deșeuri (în cazul pieilor de bovine deșeurile reprezintă circa 50% din cantitatea de piele brută), cu un conținut mare în colagen, care se utilizează și în prezent pentru numeroase produse [161].

Având în vedere că pieile reprezintă o sursă de materii prime foarte importantă pentru așa-zisa *industrie a colagenului*, pentru realizarea materialelor compozite colagenice, a biomaterialelor, a unor produse alimentare, a unor materiale pentru protecția mediului, pentru alte utilizări, s-a considerat util de a se prezenta în această lucrare unele noțiuni cu privire la prelucrarea pieilor în industria de pielărie și a diferitelor categorii de deșeuri bogate în colagen.

12.16.2.1. PIELEA ANIMALĂ

Pielea animală, constituie un *biocompozit* care nu a fost tratat în volumul I, cap.2.4. Biocompozite, al prezentului tratat, tocmai pentru a fi încadrat, mai nimerit, la acest subcapitol și la capitolul 14.

Omul a utilizat pielea animalelor sălbatice, apoi și a celor domestice încă din preistorie, pentru a-și acoperi corpul, a-și construi cortul, apoi și-a făcut îmbrăcăminte, articole de uz casnic, de podoabă, de uz personal.

Înainte erei noastre, popoarele din Asia de Sud Vest, Asia Mică, Egipt, din Nordul Africii, Europa, aveau îmbrăcăminte, încălțăminte, burdufuri pentru lichide, coifuri, scuturi, mantale din piele pentru războinici. Mai târziu, pielea a fost utilizată și pentru articole de marochinărie, îmbrăcăminte pentru mobilă, truse, tapete, pergament etc.

În ultimele secole, pielea este folosită pentru o gamă largă de sortimente de piei finite cu variate întrebuințări. În prezent, pieile de bovine, porcine, deșeurile acestora, ca și alte piei (ovine, caprine, cabaline, animale de vânat, reptile, animale marine și pești), reprezintă o bază de materii prime foarte importantă pentru așa zisa *industrie a colagenului*.

Colagenul obținut, sub diferite forme, este utilizat în scopuri medicale, ca suplimente alimentare, produse alimentare, în cosmetică, produse farmaceutice,

auxiliari pentru prelucrarea pieilor, adezivi, nutrețuri proteice, alte scopuri industriale.

Pielea, învelișul exterior al corpului omului și al animalelor, constituie organul de apărare al acestuia împotriva microorganismelor, a substanțelor vătămătoare și a acțiunilor mecanice. Pielea este regulatorul temperaturii corpului animal, este organ de secreție și de excreție, are rol senzitiv față de temperatură și funcție tactilă.

Funcțiile pielii animale determină structura sa anatomică, care este pronunțat variabilă în diferitele sale regiuni topografice și, mai ales, dependentă de specia de animale, de condițiile de viață și de mediu. Pentru a-și îndeplini funcțiile, pielea are o structură anatomică complexă în funcție de specie, mediu geografic, sex, vârstă, condiții de viață etc.

Structura pieilor, care se folosesc ca materie primă pentru industria de pielărie, este în general asemănătoare cu excepția pieilor de pești și reptile.

Pielea este compusă din trei straturi fundamentale, deosebite prin gradul de dezvoltare, scopuri fiziologice, structură histologică și compoziție chimică: *epidermul*, *dermul* și *hipodermul* (Fig.12.62.).

La stratul cornos, considerând același sens de succesiune dinspre derm, se disting: *stratul lucios*, *stratul cornos propriu-zis* și *stratul exfoliator*.

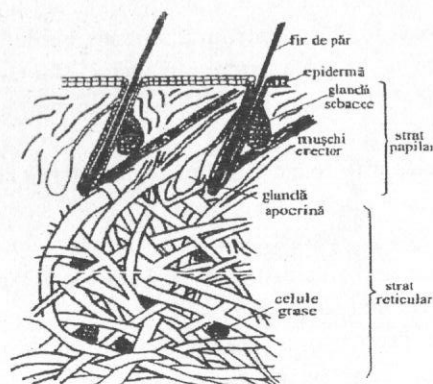


Fig.12.62. Reprezentare schematică a secțiunii verticale în pielea de vițel [308]

În tehnologiile de prelucrare a pieilor din industria de pielărie, epidermul și subprodusele sale: părul, coarnele, unghiile, penele, solzii și glandele sudoripare și sebacee se îndepărtează în cursul operațiilor preliminare tăbăcirii.

Dermul este stratul determinant pentru grosimea pielii, iar în procesul de fabricație este singura parte a pielii brute care se transformă în piele finită. Hipodermul este stratul de legătură dintre piele și corpul animalului.

Epidermul este un epiteliu stratificat, format exclusiv din celule, lipsit de vase sanguine și de nervi și despărțit de dermul pe care se sprijină, printr-o membrană bazală. El reprezintă 1-5% din grosimea pieilor la cele mai multe animale.

Epidermul poate fi divizat în două straturi distincte: un strat profund, constituit din celule a căror nucleu se pot colora intens, reprezentând partea cea mai groasă, care prin macerare îndelungată se transformă într-o masă cu aspect mucilaginos, numit *corpul mucos*, și un alt strat superficial, mai subțire, transparent și uscat, format din celule cu aspect de solzi, lipsite de nucleu, numit *stratul cornos*.

Între stratul mucos și cel cornos nu este o demarcație netă.

Stratul mucos se poate subdiviza, considerând straturile dinspre derm înspre exterior astfel: *stratul bazal* sau *germinativ*, *stratul celulelor poliedrice* sau *stratul spinos* și *stratul granulos*.

Celulele din toate straturile epidermului sunt într-o continuă evoluție și permanentă deplasare dinspre stratul bazal spre suprafața pielii. Deplasarea este însoțită de o continuă schimbare a compoziției lor chimice, până ce, în stratul exfoliator celulele se keratinizează complet, capătă aspect de solzi, se desprind și cad (vezi cap.14.).

Dermul este un țesut conjunctiv dens, a cărui grosime variază în funcție de specia animalului, vârstă, sex, mediu geografic, condiții de viață, de regiunea topografică a pielii.

Dermul reprezintă circa 85% din grosimea totală a pielii și este limitat la partea superioară de epiderm, fiind despărțit de acesta prin membrana bazală, iar la partea inferioară, este limitat de hipoderm.

Dermul este alcătuit din țesut conjunctiv, cu predominanță fibre colagenice și se împarte în două straturi: *stratul papilar* și *stratul reticular*.

Stratul papilar este porțiunea din derm, începând cu membrana bazală până în zona în care se termină rădăcinile părului. Acest strat este format din țesut conjunctiv puternic vascularizat și prezintă în partea sa superioară ondulații înfundate în epiderm numite *papile*. Stratul papilar este constituit din elemente fibrilare colagenice, elastice, reticulare, care sunt predominante, celule de diverse tipuri și substanță fundamentală.

Fibrele conjunctive și, mai ales, colagenice sunt orientate în toate direcțiile, formând o rețea puternic împletită.

Grosimea lor variază, crescând dinspre straturile superioare în profunzime. Înspre suprafața stratului papilar, ele sunt atât de fine, încât se înserează aproape invizibil în membrana bazală, care se numește astfel, deoarece reprezintă suportul stratului bazal epidermic.

În stratul papilar se găsesc numeroase celule conjunctive ca: fibroblaste, mastocite, histocite, plasmocite etc., apoi celule adipoase și pigmentare, a căror abundență depinde de regiunea pielii, specie, rasă etc.

În stratul papilar se găsesc formațiuni nervoase, vase sanguine care sunt în strânsă legătură funcțională cu epidermul.

Stratul reticular este format din fascicule de fibre colagene de diferite grosimi, orientate în toate direcțiile, o rețea de fibre elastice fine, mai abundente în zona limită dintre derm și hipoderm, unde au o orientare orizontală în raport cu suprafața pielii.

Se găsesc aceleași tipuri de celule, vase sanguine, nervi și substanță fundamentală ca și în stratul papilar. Stratul reticular are o structură mult mai densă și este mai gros decât stratul papilar.

Hipodermul sau stratul subcutan face legătura și asigură mobilitatea dintre piele și corpul animalului.

Hipodermul este format din fibre conjunctive așezate neregulat, asociate cu țesut muscular, mai mult sau mai puțin dens, țesut adipos, vase sanguine și nervi.

12.16.2.2. CONSERVAREA PIEILOR. OPERAȚIILE PRELIMINARE ȘI DE TĂBĂCIRE

Tehnologiile de transformare a pieilor crude în piei finite cuprind următoarele etape: *conservarea pieilor crude, operațiile preliminare tăbăcirii (înmuierea, depărarea sau cenușărire, șervirea, decalcificarea, sămăluirea, picla-rea)* – se obține *pielea gelatină – tăbăcirea, operațiile de finisare*. În funcție de modul de tăbăcire și de sortimentul de piele finită, se poate elimina sămăluirea și piclarea, iar operațiile de după tăbăcirea, denumite mai sus operații de finisare, sunt operațiile ce se desfășoară până la obținerea produsului finit și care depind de modul de tăbăcire și de sortimentul de piele finită [162].

Pielea proaspăt jupuită de pe animal, în abatoare, cunoscută sub denumirea de piele crudă sau verde, este frecvent supusă conservării imediat după sacrificarea animalelor, pentru a o proteja de acțiunea microorganismelor. Dacă este posibil ca prelucrarea să se facă imediat după sacrificarea animalelor, nu este necesară conservarea. Conservarea pieilor se poate realiza prin: sărare, sărare și uscare, piclare și înghețare.

Conservarea prin sărare (NaCl) se face prin presărare cu sare sau tratarea pieilor cu saramură. În prima fază a procesului de conservare, are loc difuzia sării în pielea crudă, după care urmează o anumită deshidratare, suficientă, ca în prezența sării, pieile să nu mai poată fi atacate de microorganisme.

Conservarea prin uscare este procedeul cel mai vechi și cel mai simplu de aplicat. Se urmărește aducerea pieilor la un anumit grad de deshidratare, sub care, nu mai sunt atacate de microorganisme. Conservarea prin uscare se aplică în special pieilor mici (ovine, caprine, piei de vânat), care, datorită grosimii și microstructurii, nu suferă modificări care să influențeze negativ calitatea lor.

La *conservarea prin sărare – uscare*, sărarea înlocuiește primele stadii de uscare și împiedică eventualele procese de cornificare și putrefacție a pieilor ce pot avea loc în timpul uscării.

Conservarea prin înghețare este practică în regiunile nordice, când nu sunt alte posibilități. Datorită temperaturilor joase se oprește activitatea bacteriilor asupra pielii.

Conservarea prin piclare constă în tratarea pieilor crude cu o soluție de acid tare și clorură de sodiu pentru a se împiedica umflarea pieilor care sunt aduse la un $\text{pH} \approx 2$).

Operațiile preliminare tăbăcirii pieilor au drept scop transformarea pielii crude ori conservate, în piele gelatină, care poate fi supusă apoi tăbăcirii.

În cursul acestor operații, se îndepărtează epidermul și hipodermul, iar dermul este supus unor procese chimice și fizico-mecanice. Se obține, astfel, *pielea gelatină* care, în afară de apă, în cea mai mare parte, este formată din collagen. Pielea gelatină mai conține elastină, substanțe interfibrilare și substanțe grase. Intensificarea operației de cenușărire și efectuarea sămăluirii îndepărtează, în bună parte, substanțele interfibrilare.

Înmuierea este prima operație la care se supun pieile, crude sau conservate, în vederea transformării lor în piele gelatină.

Scopul înmuierei este de a aduce pieile la hidratarea care au avut-o în momentul jupuirii de pe animal, de a le da un anumit grad de umflare, de a înlătura eventualele substanțe ce au servit la conservare, de a le curăța de toate impuritățile și de a solubiliza proteinele solubile în apă și în soluții de săruri neutre (albuminele și globulinele).

Modul de execuție a înmuierei este într-o strânsă interdependență cu modul prin care pieile au fost conservate.

Cu cât prin conservare s-a îndepărtat o cantitate mai mare de apă, cu atât vor fi necesare mai multe precauții la înmuiere, pentru a nu avea loc pierderi de substanță dermică. Înmuierea este influențată de starea pieilor și de natura lor, compoziția și temperatura apei de înmuiere, durata și coeficientul de flotă. Înmuierea se execută în butoaie rotative, hașpele, agregate helicoidale, bazine.

Pieile înmuiate se supun operației de depărare chimică sau biologică, după care urmează o depărare mecanică sau operația de cenușărire.

Operația de depărare, care constă dintr-un tratament preliminar chimic sau biologic asupra pielii, urmată de îndepărtarea mecanică a epidermului și a părului, se bazează pe degradarea hidrolitică a proteinelor protoplasmice din bulbul firului de păr și din stratul bazal al epidermului, care fac legătura dintre păr și epiderm cu dermul.

Depărarea pe cale chimică a pielii se realizează prin folosirea unor substanțe alcaline, acide, reducătoare sau oxidante.

Metodele de depărare chimică se bazează pe acțiunea conjugată a substanțelor alcaline sau acide cu a celor reducătoare sau oxidante. Se menționează depărarea cu dioxid de clor, acid percloric, ambele în mediu acid și depărarea cu pastă de hidroxid de calciu și sulfură de sodiu [162].

Cenușăirea pieilor produce, în afara desprinderii părului și a epidermului, îndepărtarea substanței interfibrilare, a celulelor țesutului conjunctiv, saponificarea și emulsionarea parțială a lipidelor, o anumită umflare a țesutului fibros al dermului și un anumit grad de afânare a acestuia. Intensitatea acestor procese, vor determina, în mare măsură, proprietățile pieilor finite.

Țesutul colagenic al dermului poate rezulta cu un anumit grad de purificare, în funcție de intensitatea cenușăririi.

Cenușăirea constă în tratarea pieilor cu soluții sau suspensii de substanțe cu efect depilator.

După felul substanțelor utilizate, se deosebesc două tipuri de cenușare: *cenușărele hidroxilice* și *cenușărele cu sulfuri*.

Cenușărele hidroxilice constau dintr-o suspensie de hidroxid de calciu alături de hidroxidul de sodiu sau hidroxidul de potasiu, amoniac, hidroxid de bariu. Cenușărele cu sulfuri sunt formate dintr-o suspensie de hidroxid de calciu la care se adaugă, ca agenți activatori, sulfura de sodiu, sulfura de calciu, sulfura de amoniu, precum și sulfurile altor metale alcaline sau alcalinoteroase.

Procedeele de cenușărire cel mai folosit este cel cu hidroxidul de calciu și sulfura de sodiu, ca și cenușărele numai de hidroxid de calciu, în anumite scopuri. Cenușăirea pieilor se poate executa în bazine, când este necesară și depărarea mecanică, ca operație separată, sau în butoaie rotative, hașpele sau agregate helicoidale, când desprinderea părului și a epidermului au loc datorită frecării pieilor între ele în timpul agitării la care sunt supuse în utilajele respective.

După depărarea sau cenușăirea în utilaje cu agitare, pieile se supun operației de *fățuire* și apoi operației de *șeruire* [162].

Șeruirea este o operație mecanică ce are drept scop îndepărtarea țesutului hipodermic, care aderă la derm, împreună cu unele resturi de carne și grăsimi.

Pielea rezultată după operația de șeruire poartă numele de *piele gelatină*, numindu-se la fel și după eventuala *sămăluire* și *piclare*, deci până la *tăbăcire*. După operația de șeruire unele piei mai groase, cum sunt cele de bovine, pot fi supuse operației de *șpăltuire* care are drept scop de a uniformiza grosimea sau de a despica pielea în două sau în mai multe straturi.

Se obține, de obicei, un *șpalt de față*, care este pielea propriu-zisă și un *șpalt de carne sau șpaltul*. Șpălțuirea se efectuează asupra pielii gelatină sau după tăbăcirea în crom.

Pielea gelatină, în această fază a procesului tehnologic, este puternic alcalină și are un anumit grad de umflare. De aceea, se supune *operației de decalcificare* în toată grosimea și, în puține cazuri numai superficial, îndepărtându-se varul și celelalte substanțe alcaline sub formă de compuși solubili în apă.

De asemenea, are loc dezumflarea osmotică astfel, ca la contactul cu soluțiile tanante acide să nu se producă crisparea feții, defect ce va rămâne vizibil pe produsul finit. Decalcificarea se poate desăvârși și în operațiile următoare de sămăluire și piclare.

Decalcificarea se realizează cu acizi, care formează cu alcaliile din pielea gelatină săruri ușor solubile în apă, pentru a fi ușor spălate, iar acizii utilizați să nu umfle pielea gelatină și să nu acționeze liotropic asupra colagenului. De asemenea, la decalcificare se utilizează sărurile amoniacale, mai ales clorura de amoniu și săruri acide (bisulfatul de sodiu și bisulfatul de sodiu).

Sămăluirea este un tratament enzimatic la care se supun pieile gelatină decalcificate, cu scopul de a crește afănarea țesutului colagenic, de a îndepărta substanțele interfibrilare, săpunurile de calciu, o parte din substanțele grase, de a îndepărta resturile de epiderm și rădăcinile de păr care au mai rămas în piele și de a desăvârși desumflarea pielii.

Ca urmare, pieile finite vor manifesta o anumită moliciune, suplețe, plasticitate, extensibilitate și o față deosebit de fină.

După origine, se deosebesc patru sisteme enzimatice care produc sămăluirea: sistemul de proteaze al pepsinei, care se găsește în stomacul vertebratelor;

sistemul de proteaze al tripsinei din pancreas, numit și „pancreatină”; sistemul de proteaze al catepsinei din diferitele organe ale corpului ca: ficatul, rinichii și sistemul de proteaze vegetale, al plantelor superioare și inferioare, ca de exemplu, papaina arborelui de pâine și proteazele extrase din unele levuri, mucegaiuri și, mai ales, din bacterii.

Proteazele triptice pancreatice au cea mai mare utilizare pentru sămăluirea pieilor și apoi preparatele enzimatice bacteriene (din *Bacillus erodians*, *Bacillus mesentericus* etc.) și preparatele enzimatice din mucegaiuri (*Aspergillus orisae*, *Aspergillus parasiticus*, *Penicillium*).

Piclarea are drept scop de a aduce pielea gelatină la un anumit pH acid, pentru a putea fi supusă tăbăcirii cu săruri bazice de crom, aluminiu, zirconiu, cu care ocazie se oprește acțiunea enzimelor de la sămăluire și se produce o anumită afănare și deshidratare a pielii, piclarea efectuându-se cu o soluție de acid și clorură de sodiu.

Tăbăcirea pieilor. Pielea animală are o serie de însușiri care trebuie modificate în cursul procesului tehnologic a transformării sale în piele finită.

În stare umedă, pielea este atacată de microorganisme, prin uscare devine cornoasă și suferă procesul de denaturare prin încălzire ușoară. În urma tăbăcirii, pielea devine rezistentă față de agenții ce produc putrefacția, în urma uscării își păstrează moliciunea și elasticitatea, care sunt mai mult sau mai puțin accentuate, în funcție de modul de tăbăcire.

Pielea tăbăcită are o temperatură de contracție și o rezistență față de apa fierbinte mult mai mari.

Prin tăbăcire se reduce mult caracterul hidrofil al pielii. Datorită interpușii substanțelor tanante, se produce o separare a fibrelor pielii.

Procesul prin care se introduce în derm substanța care provoacă modificările proprietăților elementelor structurale amintite, față de proprietățile elementelor din pielea gelatină, se numește tăbăcire, iar pielea obținută se numește piele tăbăcită.

Toate substanțele capabile să producă astfel de modificări se numesc substanțe tanante.

Gradul modificării proprietăților elementelor structurale ale dermului poate fi exprimat numeric prin temperatura de contracție.

Tăbăcirea pieilor se poate efectua cu substanțe foarte diferite din punct de vedere chimic, așa cum sunt: *substanțele tanante vegetale, substanțele tanante sintetice, sărurile de crom, aluminiu, fier, zirconiu, acizi polifosforici, acidul silicic, aldehydele, grăsimile, izocianatii, rășinile*. La toate modurile de tăbăcire aplicate pieilor un rol însemnat îl are pH-ul (Fig. 12.63.).

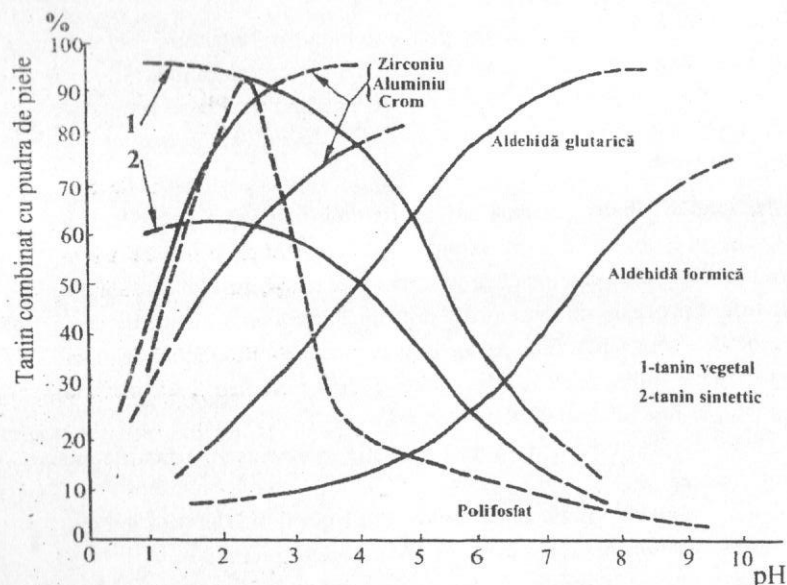


Fig. 12.63. Dependenta combinării tananților cu colagenul în funcție de pH [310].

Tăbăcirea vegetală se aplică pentru obținerea pieilor caracterizate prin plinătate, fermitate, cum sunt pieile pentru talpă, harnașamente, dar și pentru marochinărie, tapițerie, haine și fețe de încălțăminte.

Taninurile vegetale sunt compuși fenolici care se pot grupa în: taninuri pirogaloalice sau hidrolizabile și taninuri catechinice sau condensate.

La tăbăcire, o parte din taninul pătruns în piele se combină la grupele peptidice ale colagenului prin legături de hidrogen și, în timp, este posibil să se formeze legături electrovalente și covalente (Fig. 12.64.).

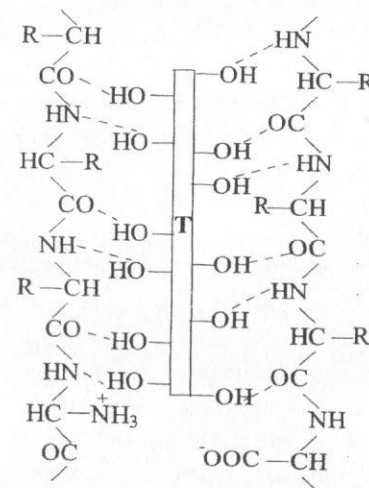


Fig. 12.64. Legături de hidrogen între grupele hidroksilfenolice ale tananților vegetali și ale tananților sintetici de înlocuire cu lanțurile polipeptidice ale colagenului (T=tanant vegetal și tanant sintetic de înlocuire).

La tăbăcire, alături de tananții vegetali se utilizează și tananți sintetici, compuși cu structură diferită de a tananților vegetali, dar sunt compatibili și au proprietăți comune cu tananții vegetali, prin faptul că sunt solubili în apă, se combină cu substanța dermică și o fac imputrescibilă.

Tananții vegetali și sintetici au în structura lor nuclee aromatice benzenice. La tananții sintetici aceste nuclee sunt activate de o serie întreagă de grupe ca: hidroksilfenolice, sulfonice, punți sulfonice, sulfoxilice și sulfonimidice.

Unii tananți sintetici au proprietăți fizico-chimice mai apropiate de cele ale tananților vegetali, pentru care pot fi folosiți într-un procent mai mare alături de aceștia și combinarea lor cu pielea se datorește, în principal, grupelor hidroxil-fenolice prezente în număr mare în structura lor (tananții sintetici de înlocuire) (Fig.12.64.).

Alți tananți sintetici, se folosesc, în cantități mici, alături de tananții vegetali în variate scopuri și sunt formați dintr-un rest mare hidrofob și o grupă terminală puternic hidrofilă ($-\text{SO}_3\text{H}$). Aceștia se combină cu grupele aminice ale colagenului prin legături de electrovalență și, mult mai puțin, prin legături de hidrogen (tananți sintetici auxiliari) (Fig.12.65.).

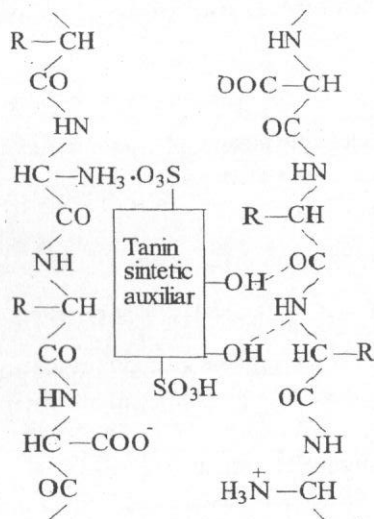


Fig.12.65. Reacții ale tananților sintetici auxiliari cu colagenul

Tăbăcirea vegetală poate fi combinată cu alte moduri de tăbăcire (săruri bazice de crom, săruri de aluminiu, cu aldehide etc.) pentru motive tehnologice și pentru a imprima anumite caracteristici pieilor tăbăcite (Fig.12.66.).

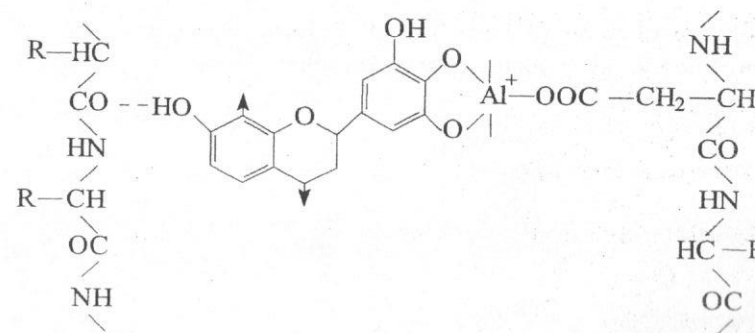
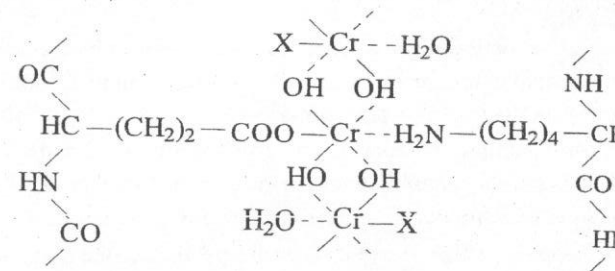


Fig.12.66. Legătură transversală între lanțurile polipeptidice ale colagenului prin intermediul unui complex Al-mimoza.

Tăbăcirea în crom. Pentru tăbăcirea în crom prezintă interes sărurile cromului tri- și hexavalent.

Cromul hexavalent este redus la crom trivalent și sărurile cromului trivalent sunt transformate în săruri bazice, compuși complecși, care prezintă în sfera lor interioară grupări hidroxilice [162, 309].

Sărurile bazice de crom reacționează cu grupele carboxilice ale colagenului prin legături de covalență de coordinație, cu grupele aminice și hidroxilice prin legături de coordinație:



Legături de hidrogen se pot forma între hidrogenul grupelor hidroxilice neolificate ale complexelor bazice de crom și azotul sau oxigenul grupelor

funcționale ale colagenului. Se pot forma și legături electrovalente între ioni complecși ai cromului încărcati pozitiv și grupele carboxilice ale colagenului încărcate negativ (Fig.12.67).

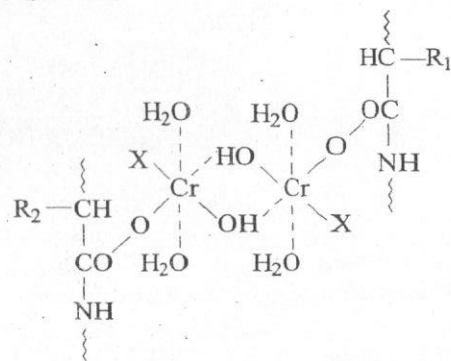


Fig.12.67. Legături de coordinație ale complecșilor bazici de crom cu grupele carboxilice și aminice ale colagenului

Grupele peptidice ale colagenului nu se combină cu sărurile bazice de crom.

Tăbăcirea în crom se poate efectua prin două procedee principale: tăbăcirea cu o baie, care este aplicată aproape în exclusivitate și tăbăcirea în crom cu două băi [162, 309].

Prin tăbăcirea în crom se obține o gamă foarte variată de piei finite, caracterizate prin rezistență ridicată la temperatură, la acizi și baze, la lumină, moli-ciune, suplețe, rezistență bună la tracțiune și alungire.

Obiectele confecționate din piei tăbăcite în crom au o durabilitate mare la purtare. Pieile finite pot fi utilizate la confecționarea încălțămintei, a mănușilor, a articolelor de îmbrăcăminte, a articolelor tehnice, a ortezelor, protezelor etc.

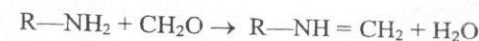
Pielele și blănurile lavabile utilizate ca biomateriale pentru confecționarea de cerceafuri pentru întreținerea igienei pacienților imobilizați la pat sunt tăbăcite combinat, săruri de crom și aldehydă glutarică.

Tăbăcirea cu aldehyde. Aldehyda formică, aldehyda glutarică și, mai puțin alte aldehyde, s-au dovedit a fi substanțe tanante valoroase, care au fost folosite la prelucrarea pieilor, mai ales în tăbăcirile combinate.

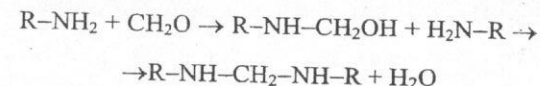
Formaldehida, ca și alte aldehyde, reacționează cu grupele bazice ale colagenului la diferite valori de pH, când acestea nu sunt încărcate electric, ceea ce face ca aldehydele să se combine cu colagenul într-un domeniu larg de pH.

Astfel, grupele α -aminice libere încep să devină neîncărcate electric la un pH > 6, grupa ϵ -aminică de la lizină la pH > 9, grupa guanidinică de la arginină la pH > 11 și grupa amidică de la asparagină și glutamină la pH > 4.

La pH slab acid, aldehyda formică reacționează cu grupele aminice libere formând azometinele sau bazele Schiff:

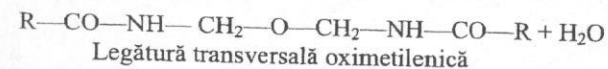
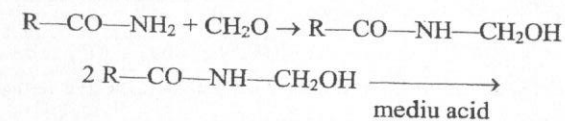


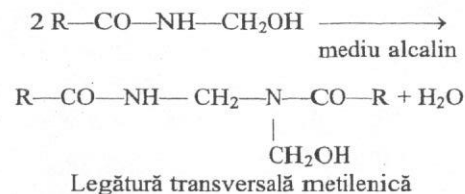
În mediu neutru și mai ales slab alcalin, în urma reacției între grupele aminice libere și aldehyda formică, iau naștere grupări metilolice care, la rândul lor, duc la formarea de punți metilenice:



Grupele ϵ -aminice ale lizinei și grupele guanidinice ale argininei sunt mult mai reactive și mai numeroase decât grupele α -aminice terminale ale colagenului.

Grupele amidice ale resturilor laterale ale argininei și glutaminei formează metilendiamide cu aldehyda formică. De asemenea, între grupele amidice și aminice libere, se pot forma punți transversale foarte stabile:





Pielea tăbăcită cu formaldehidă este albă, moale și fără plinătate. Tăbăcirea numai cu aldehydă formică se întrebuintează destul de rar, dar are aplicații în tăbăcirile combinate.

Dialdehidele ca: glioxalul, aldehyda glutarică, aldehyda α -hidroxi adipică, amidon-dialdehyda, aldehyda malonică, aldehyda succinică au proprietăți tanante datorită prezenței celor două grupe carbonilice într-o moleculă de dimensiuni relativ mici, care pot favoriza formarea de legături transversale între două lanțuri polipeptidice alăturate.

Chimismul tăbăcirii cu dialdehide este același ca și în cazul tăbăcirii cu formaldehydă, unele diferențe existând la valorile diferiților parametri tehnologici de execuție practică a tăbăcirilor [310-318].

Dintre dialdehide, importanță practică deosebită are aldehyda glutarică.

Reacția dintre aldehyda glutarică și grupele ε -aminice ale lizinei este reprezentată în figura 12.68.

Aldehyda glutarică conferă pieilor tăbăcite o rezistență deosebită la acțiunea transpirației și la spălări repetate, păstrându-se dimensiunile și moliciunea inițiale. Se folosește la obținerea pieilor și blănurilor lavabile de interes medical.

Pielele tăbăcite cu aldehydă glutarică sunt galbene, foarte suple și cu proprietăți fizico-mecanice corespunzătoare. Se utilizează în tăbăcirile combinate cu crom, aluminiu și grăsimi.

Tăbăcirea cu grăsmi are o largă utilizare la producerea pieilor șamoă, caracterizate printr-o mare moliciune, suplețe, porozitate, folosite pentru mănuși, haine, încălțăminte pentru sport, ortopedie, filtre pentru benzină, la căptușirea cutiilor pentru aparatele optice etc.

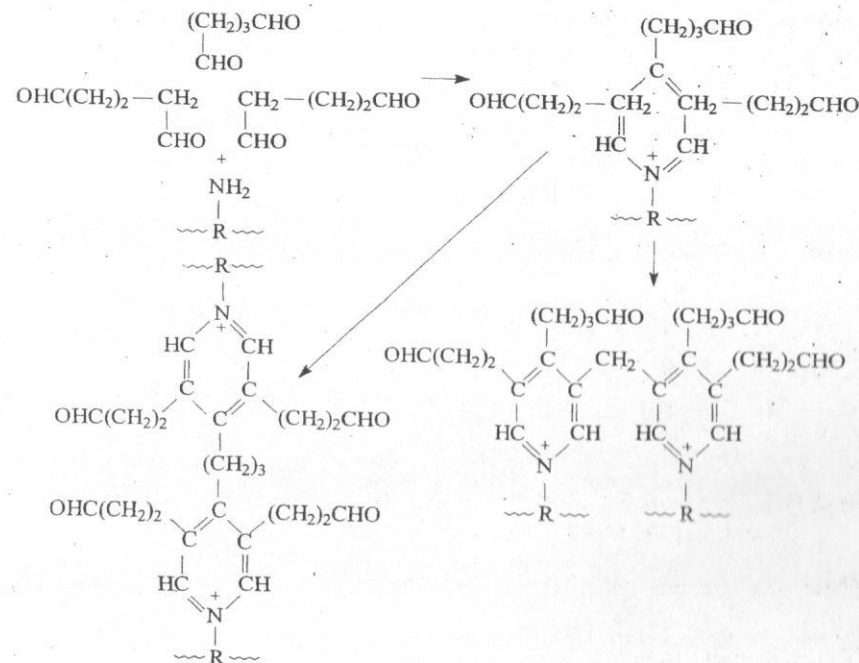


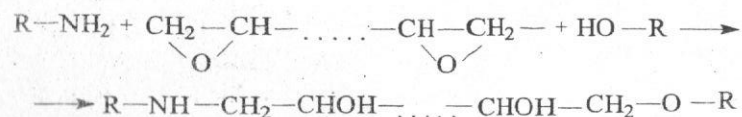
Fig.12.68. Mecanismul condensării aldolice în reacția aldehydei glutarice cu colagenul.

La tăbăcire, se folosesc uleiurile cu un anumit grad de nesaturare (uleiuri de pește, focă, morskă, delfin, morun, balenă, rechin. Frecvent, este folosit uleiul de ficat de morun (indicele de iod=160-180), grăsimea de focă (indicele de iod =145-182), grăsimea de delfin (indicele de iod=130-140).

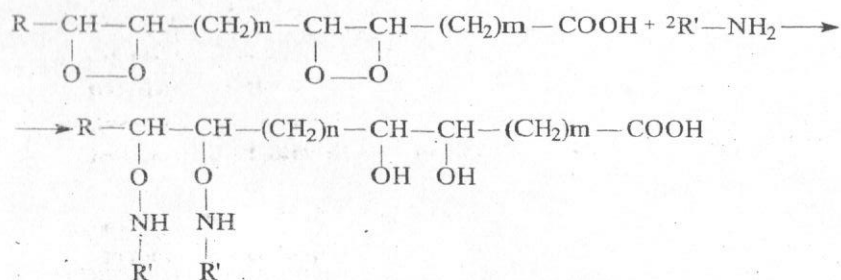
La tăbăcire, în procesul de auto-oxidare a grăsimilor nesaturate se formează o serie de grupe reactive: grupe aldehydice, cicluri etilenoxidice (grupe epoxidice) și grupe peroxidice.

Aldehidele se combină cu grupele bazice ale pielii, contribuind la creșterea temperaturii de contracție a pieilor tăbăcite, la mărirea stabilității la alcalii.

Grupele epoxidice reacționează cu diferite grupe funcționale ale colagenului:

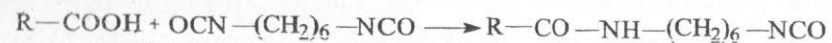


Grupele peroxidice se combină cu grupele bazice ale pielii:

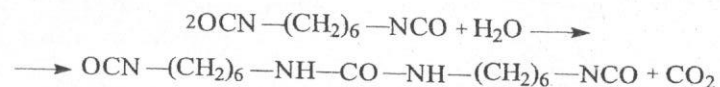


Tăbăcirea cu diizocianați. Diizocianații alifatici și în special hexametilen-diizocianatul, pot fi utilizați la tăbăcire, în vederea obținerii de piei suple și cu rezistențe mecanice superioare.

Reacțiile ce pot avea loc între diizocianați și grupele reactive ale colagenului sunt următoarele:



Diizocianații reacționează cu apa formând grupări ureidice și bioxid de carbon care se elimină:



În vederea tăbăcirii, pieile pretăbăcite cu aldehidă formică sau glutarică, sau cu săruri bazice de crom, și uscate, se tratează cu 3–4% hexametilendiizocianat, sub formă de soluție, prin agitare la butoi, la temperatura de 30°C, timp de 8–10 ore. Se face o spălare intensă cu apă a pieilor pentru a se bloca toate grupele de diizocianat rămase libere.

Celelalte moduri de tăbăcire care s-au menționat mai sus, importante pentru industria de pielărie se găsesc tratate pe larg în tratatele de specialitate [162, 309].

Având în vedere cadrul acestei lucrări, fazele tehnologice de după tăbăcire, până la obținerea produselor finite, și care sunt specifice fiecărui produs, sunt foarte diverse și nu s-a socotit a fi necesar să se aloce un spațiu pentru descrierea lor.

12.16.3. MATERIALE COLAGENICE

Pielea animală reprezintă materia primă foarte importantă pentru realizarea de materiale compozite colagenice, biomateriale, produse de uz medical, farmaceutic, alimentar, materiale pentru protecția mediului și alte utilizări.

Pentru anumite scopuri, se utilizează pielea gelatină în întregimea ei, fracțiunile cele mai bogate în collagen, dar și deșeuri de piele gelatină sau chiar tăbăcită. S-a arătat că la prelucrarea pieilor în fabricile de pielărie, alături de produsele finite, rezultă o cantitate mare de deșeuri, care depășește uneori 50% din greutatea pielii brute ce intră în fabricație.

Valorificarea deșeurilor de piele se poate realiza în următoarele domenii:

- industria de pielărie - peliculogeni pentru finisarea pieilor, produse de umplere a pieilor, piele semisintetică;
- industria chimică - gelatină alimentară, gelatină fotografică, clei, produse tensioactive biodegradabile;

– medicina umană – pansamente pentru arsuri, piele artificială, spume de colagen, membrane oftalmologice, colagen pentru impregnarea protezelor vasculare etc.

– industria alimentară – mațe artificiale pentru cârnați, concentrate de aminoacizi;

– industria farmaceutică;

– industria cosmetică – hidrolizate de colagen pentru loțiuni, creme de față, șampoane;

– agricultură – substanțe furajere, îngrășăminte azotoase.

Pielea animală, ca și deșeurile de piele din industria pielăriei și a confecțiilor din piele sunt neomogene și, din această cauză, nu pot servi ca atare drept materie primă pentru orice utilizare. De aceea, pentru cele mai multe întrebuințări ele trebuie transformate mai întâi în una din următoarele forme: paste, geluri, soluții, sau hidrolizate de colagen.

12.16.3.1. BIOMATERIALE COLAGENICE

Biomaterialele colagenice sunt compozite la care alături de colagen pot participa: proteine (miozina, actina, fibroina, elastina etc.), polizaharide vegetale (celuloză, amidon etc.), polizaharide animale (acidul hialuronic, condroitin sulfatii, heparina, sulfatul de keratan, sulfatul de heparină, sulfatul de dermatan, chitina, chitosanul), polimeri sintetici (poliacrilai, poliuretani, poliesteri etc.), lipide, medicamente.

Biomaterialele colagenice au o largă utilizare în diverse scopuri astfel:

– biomaterialele, sub formă de foi sau filme, se utilizează pentru pansarea rănilor, refacerea țesuturilor oromaxilofaciale, ca senzori și biosenzori etc.;

– bureți (foi poroase) pentru tamponare hemostatice, pansamente pentru răni deschise, regenerarea pielii și a cartilajelor, suport pentru ingineria tisulară, măști cosmetice etc.;

– filamente pentru regenerarea ligamentelor și tendoanelor, sutură etc.;

– tuburi pentru regenerarea tisulară ghidată a nervilor, ingineria tisulară a vaselor de sânge etc.;

– microsfele și granule pentru dozarea controlată a compușilor biologici activi;

– biomateriale solide pentru componente de protezare a țesutului osos;

– geluri pentru dozarea controlată a compușilor biologici activi, regenerarea tisulară a țesuturilor moi și tari, cosmetică, igienă corporală;

– soluții pentru regenerarea tisulară a țesuturilor moi, dozarea controlată a compușilor biologici activi, înlocuitori de plasmă etc.

Pansamente pentru regenerarea pielii. Biomaterialele folosite pentru regenerarea tisulară a pielii sunt adaptate chimico-morfologic la zonele ce urmează a fi reconstruite cum sunt: suprafețe de piele lipsă cauzate de arsuri, ulceratii, diferite afecțiuni dermice, traumatisme mecanice, zone de reconstrucție cu cavități profunde (cavități în țesutul osos generate prin traumatisme mecanice), zone amputate în care porțiuni de nervi, cartilaje, oase și vase de sânge au fost îndepărtate prin secționare [136, 319 – 336].

Biomaterialele pentru regenerarea pielii trebuie să fie biocompatibile, să aibă o bună adeziune la țesutul înconjurător vechi și o structură chimico-morfologică adecvată regenerării tisulare, să prezinte o porozitate care să permită inducția și conducția celulară și a nutrienților. Aceste biomateriale pot fi biodegradabile sau nebiodegradabile; în primul caz, timpul de biodegradare trebuie să aibă o valoare apropiată de cea corespunzătoare țesutului respectiv.

Biomaterialele pentru regenerarea tisulară pot fi realizate din fibre de colagen, colagen nativ solubil, hidrolizate de colagen și gelatină.

Principalele biomateriale pentru regenerarea tisulară sunt foile buretoase, tuburile și gelurile care pot fi: inerte din punct de vedere biologic, când nu conțin auxiliari pentru activarea proliferării celulare; activate biologic, când conțin glicozaminoglicani și factori de creștere; biomateriale care conțin atât celule cât și stimulatori de proliferare [136].

Foliile buretoase colagenice care se folosesc ca pansamente pentru vindecarea arsurilor de piele pot fi obținute astfel: o soluție acidă de colagen nativ cu concentrația de 0,3% la pH=3, se supune centrifugării cu 1800–2000 rot/min, timp de 60 min, la temperatura de 4°C, pentru a se produce spumarea. Se toarnă spuma în matriță și se congelează la -40°C [319].

Se usucă prin liofilizare la -40°C , timp de 48 ore.

Urmează o reticulare hidrotermică prin uscare la vid la temperatura de 105°C , timp de 24 ore, apoi o reticulare chimică, prin imersia buretelui într-o soluție de 0,2% aldehydă glutarică și 0,05% acid acetic, timp de 24 ore, la temperatura de 4°C . Urmează:

- neutralizarea buretelui cu o soluție tampon tip fosfat și 0,5% NaCl, timp de 6 ore;
- spălarea buretelui neutralizat cu o soluție apoasă de 15% etanol;
- congelarea rapidă a buretelui la -135°C ;
- uscarea prin liofilizare la -135°C timp de 48 ore;
- sterilizarea în atmosferă de etilenoxid;
- ambalarea.

Biomateriale cu structură poroasă similară, rezultate prin liofilizare, s-au obținut și din amestecuri sub formă de paste de fibre și diverse polizaharide cuplate ionic [329–332].

Buretele de collagen se formează, în general, prin înghețare–uscare a unei soluții apoase de collagen [383–385].

Procesul de înghețare–uscare cuprinde înghețarea unei soluții apoase de collagen sau a gelului de collagen, la temperatură coborâtă și, ulterior, sublimarea cristalelor de gheață prin vacuum la temperatură coborâtă. Temperatura de înghețare și durata înghețării au unele efecte asupra structurii poroase a buretelui de collagen care rezultă.

Înghețarea rapidă conduce la canale mici, uniforme și producerea unei structuri fibroase.

Înghețarea lentă, conduce la neuniformități, pori largi și mulți pori colapșați [386, 387]. Structura de susținere a bureților de collagen a fost folosită în ingineria tisulară pentru diferite țesuturi și organe.

Pielea artificială sau *autogrefa de piele* se obține prin proliferarea fibroblastelor și keratocitelor, provenite prin biopsie de țesut sănătos, în prezența unui biomaterial ca suport de ancorare și a unui mediu de cultură conținut dintr-o soluție de nutrienți și o atmosferă de CO_2 , prin incubare la 37°C , pe o perioadă de timp care să asigure biodegradarea totală a biomaterialului suport,

formarea unei matrici noi extracelulare, diferențierea celulelor în noua matrice extracelulară, dobândirea de către matricea extracelulară, nou formată, a proprietăților biochimice, fizico-chimice și mecanice adecvate efectuării greșii [136, 337–347].

Calitatea de suport pentru ancorarea și proliferarea celulelor o are un biomaterial colagenic sub formă de film buretos [340], geluri polifazice (soluție de collagen și fibre de collagen) [337] sau numai soluție de collagen, în stare liberă.

Materialul colagenic reprezentativ este soluția acidă de collagen nativ din pielea de vițel, iar componentul necolagenic cel mai folosit este condroitin sulfatul A.

Pentru exemplificare, se prezintă schema de obținere a pielii artificiale pe suport de tip gel polifazic (Fig. 12.69.).

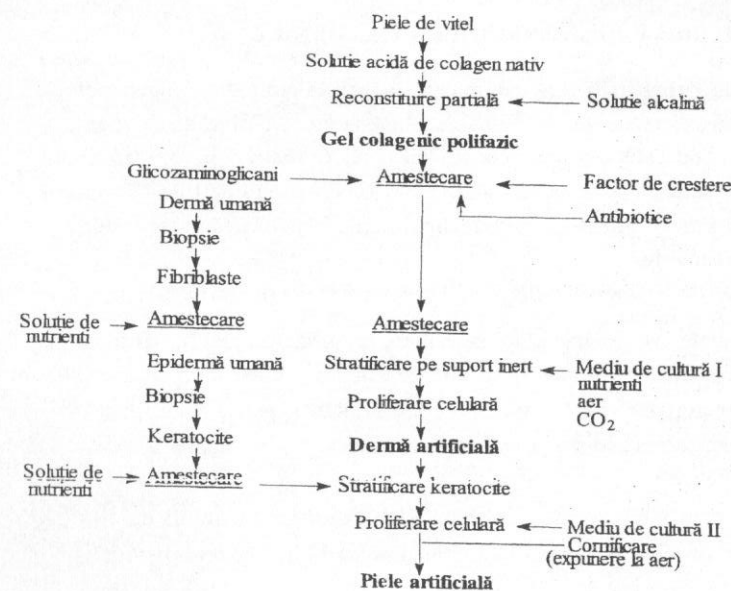


Fig.12.69. Schema tehnologiei de obținere a pielii artificiale [339].

Fire chirurgicale. Firele chirurgicale, în bună parte, sunt de natură colagenică, rezultate prin prelucrarea intestinelor de animale [348]. Având în vedere posibilitățile limitate pentru o astfel de materie primă, s-au realizat fire chirurgicale pornindu-se de la soluții acide de colagen nativ obținute din piei de vițel [349].

Astfel, o soluție acidă de colagen nativ obținută din piele de vițel, cu concentrația de 0,3% și pH=2, se extrude printr-o filieră cilindrică, cu diametrul de 0,3 mm, imersată într-o soluție ce conține 135 mM NaCl, 30 mM sulfat de N-tris (hidroximetil-2-aminoetan) și 30 mM fosfat disodic pentru a se produce precipitarea.

Firul format se aduce la pH=7,5 prin neutralizare cu o soluție de NaOH.

Firul se imersează, timp de 4 ore, în alcool izopropilic, apoi se rehidratează în apă distilată timp de 15-20 min și se usucă în aer în stare tensionată.

Firele uscate se supun reticulării hidrotermice într-o etuvă, timp de 1-5 zile la o temperatură crescândă de 60-120°C, în vid la presiunea de 0,1 torr.

Rezistența la tracțiune a firelor astfel obținute crește până la temperatura de 110°C, iar peste 120°C se produce degradarea termică a lor. Comportarea reologică a firelor umede este similară țesutului conjunctiv nativ.

Autogrefe de vase de sânge. Producerea autogrefelor de vase de sânge, în comparație cu obținerea pielii artificiale, necesită utilizarea unui număr sporit de celule în strictă corelație cu numărul de straturi din care se compun vasele de sânge [350, 351, 406, 408, 409, 410].

Pentru producerea unei autogrefe vasculare se extrag dintr-o venă sau o arteră trei tipuri de celule:

- celule endoteliale ale stratului intern (*intima*);
- celule musculare aparținând stratului median (*media*);
- fibroblaste din stratul extern (*adventitia*).

Ultimele două tipuri de celule sunt cultivate separat pe suporturi colagenice, în mediu de cultură adecvat. Apoi, media artificială este rulată pe o mandrină. După șapte zile de ședere în mediul de cultură, media artificială se sudează și face posibilă rularea peste ea a adventiceei.

După câteva săptămâni de menținere a ansamblului, în mediul de cultură, are loc sudarea straturilor și face posibilă scoaterea mandrinei și introducerea celulelor endoteliale [136].

Produse farmaceutice. Pentru diferitele produse farmaceutice se folosesc: gelatina, soluțiile acide de colagen nativ și colagenul solubilizat, realizându-se preparate injectabile, pentru administrare orală, de uz extern și pentru contact sanguin.

Pentru preparatele injectabile se utilizează soluțiile acide de colagen nativ sau colagen reconstituit din astfel de soluții. Preparatele injectabile se folosesc pentru la tratamentul ridurilor și al ulcerărilor, și conțin, alături de colagen antibiotice, vitamine etc.

Se produc preparate injectabile intramuscular constituite din microparticule în suspensie de gelatină sau colagen solubilizat din colagenul insolubil și diferite principii active [352, 353].

Preparatele farmaceutice colagenice, pentru administrare orală, se prezintă sub forma unor pulberi sau în stare lichidă, încapsulate în cașete de gelatină.

Produsele de uz extern conțin, alături de colagen, compuși biologic activi (medicamente, enzime, extracte animale sau vegetale etc.) care au capacitatea de a difuza transdermic spre țesuturi mai profunde, fiind apoi preluate de fluxul sanguin [355, 356].

Aceste produse se prezintă sub forma unor geluri sau unguente, ca și preparate care se dozează controlat, transdermic, din care medicamentele se sunt administrate continuu, în timp îndelungat (Fig.12.70.).

Preparatul farmaceutic se găsește într-un dispozitiv de ancorare pe suprafața pielii (plasturi și dispozitive transdermale) [355].

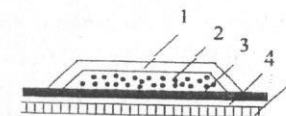


Fig. 12.70. Schema dispozitivului de dozare controlată transdermică a medicamentelor. 1. caserolă polimerică; 2. gel cu medicamentul; 3. membrană microporoasă; 4. strat adeziv; 5. strat absorbant.

Transferul de masă transdermic se face prin difuzie, ca urmare a sorbției umidității de la suprafața pielii, urmată de dizolvarea compusului biologic activ și transferul prin membrana dispozitivului, prin epiderm și derm, către vasele sanguine.

Colagenul este implicat în constituirea rezervorului de medicament și joacă, uneori, și rol de membrană de control al fluxului de principiu activ [355].

Preparate pentru contact sanguin. Aceste preparate pun în valoare proprietățile hemostatice ale materialelor colagenice (coagularea sângelui, oprirea hemoragiilor). Preparatele hemostatice sunt formate din bureți de gelatină, fibră de colagen, soluție acidă de colagen nativ, colagen solubilizat din colagen insolubil.

Producerea fibrelor de colagen și elastină cu diametru mic și a rețelelor de fibre. Ca principal component al matrixului extracelular, colagenul este omni-prezent în toate țesuturile conjunctive, iar în cantități mari, mai ales în derm, tendon, cartilaj, os.

În țesutul conjunctiv nativ, moleculele de colagen formează elemente fibrilare cu diametrul de 10 până la mai multe sute de nanometri, organizate în rețeaua proteică a variatelor arhitecturi.

Rezistența la tracțiune a colagenului, stabilitatea sa în mediul biologic și capacitatea sa de ligand specific pentru suprafața celulelor sunt proprietățile care, în mare măsură, sunt dependente de integritatea colagenului caracteristică conformației sale de triplu helix (390-393).

Colagenul este o proteină structurală biodegradabilă, biocompatibilă și neimunogenă, proprietăți care-l fac să fie component adecvat pentru variate aplicații medicale. Ca biomaterial, colagenul a fost folosit predominant ca pudră sau pastă, hidrogel după faza de reticulare a soluției sau ca *matrice poroasă* cu sau fără adaosul altor componente după congelare-uscare [394].

De exemplu, colagenul a fost utilizat în cosmetică și chirurgia urologică, în calitate de component injectabil pentru creșterea în mărime sau în volum a țesutului [395], chirurgia ortopedică, ca matrice implantabilă la promovarea creșterii osului și în chirurgia plastică și generală, ca agent local pentru trata-

mentul plăgilor și rănilor arse cronice sau ca model pentru regenerarea țesutului [396].

Electrofilarea nanofibrelor de elastină și colagen și aplicațiile lor ca biomateriale. Electrofilarea este o tehnică care se bazează pe forțele electrostatice, pentru a se produce fibre nano- și micrometrice din soluții de polimeri sau din topituri.

Electrofilarea este esențială în procesul de tragere, utilizând interacțiunile electrostatice pentru realizarea lungimii firelor cu diametre uniforme.

Acest proces este diferit de metodele tradiționale de formare a fibrelor bazate pe alungirea jetului vâscoelastic a soluției de polimer sau a topiturii. Această metodă este optimă pentru realizarea nanofibrelor [388, 428, 430].

Electrofilarea este o variantă a tehnicii de electropulverizare.

Ambele implică utilizarea unei tensiuni electromotoare pentru a se crea un jet de soluție de polimer. Electropulverizarea produce dezvoltarea unor picături mici a unei soluții de joasă concentrație, rezultând prin cădere o suprafață neregulată. Electrofilarea duce la formarea unor fibre cu diametru mic din soluții înalt vâscoase [389].

Nanofibre de colagen electrofilate. Producerea fibrelor de colagen, prin tradiție, se bazează pe procesul de filare umedă, care implică extruderea unei soluții de colagen, printr-o filieră, într-o baie de coagulare acid-salină, care uzual constă din sulfat de amoniu în apă, acid acetic, izopropanol sau acetonă.

Sunt necesare adesea tratamente suplimentare cu soluții de etanol și acetonă pentru deshidratarea fibrei.

De exemplu, Hirano [397] descrie realizarea fibrelor de chitosan-colagen ($d > 30 \mu\text{m}$) produse prin filare umedă în acid acetic diluat-soluție de metanol și o soluție amoniacală ce conține 40-43% sulfat de amoniu.

Fofonoff și Bell [398] au prezentat o metodă de formare a fibrelor de colagen ($d > 100 \mu\text{m}$), prin filare umedă cu soluție apoasă de acid acetic, în baie de coagulare la cald care conține acid boric. Fibra de colagen este formată prin polimerizare, când acidul din colagen este neutralizat și fibrele de colagen sunt ulterior deshidratate într-o baie de acetonă și etanol.

Cercetarea în domeniu filării umede a colagenului a făcut progrese și s-au realizat îmbunătățiri semnificative. Pentru obținerea fibrelor de colagen cu diametrul submicrometric, electrofilarea recent investigată, s-a dovedit superioară celorlalte procese [399–404]. Arhitectura generată de acest proces este similară cu aceea formată în cele mai multe matrici extracelulare native [426–432].

Produse cosmetice. Produsele cosmetice pe bază de colagen sunt: soluții de colagen nativ, hidrolizate, emulsii, creme, geluri, membrane și folii poroase.

Aceste produse au acțiune regeneratoare a țesutului conjunctiv, mențin starea de hidratare normală a pielii, ușurează pătrunderea transdermică a unor compuși biologic activi, protejează părul și pielea de acțiunea unor factori de mediu, ușurează eliminarea excesului de materii grase și toxine.

12.16.3.2. MATERIALE ALIMENTARE

Colagenul ca produs pentru hrană. Nevoia de proteine pentru alimentație a determinat persoanele din unele țări sărace să utilizeze pielea bovinelor pentru hrană. Colagenul este complet digerabil, dar este o proteină incomplet nutritivă. Valoarea sa nutritivă este de doar 80% din cea a cazeinei [357].

În tabelul 12.30. este prezentată situația aminoacizilor esențiali existenți în colagen. Pentru scopuri alimentare, se folosesc pieile proaspete de bovine a căror identitate este cunoscută.

Tabelul 12.30.

Situația aminoacizilor esențiali din colagen

Aminoacidul	Necesitatea umană, g/zi	Grame de aminoacizi în 100 g colagen	Excex (+) sau deficit (–)
Triptofan	0,5	0,0	– 0,5
Fenilalanină	2,2	2,4	+ 0,2
Lizină	1,6	4,0	+ 2,4
Treonină	1,0	2,3	+ 1,3

Metionină	2,2	1,0	– 1,2
Leucină	2,2	3,7	+ 1,5
Izoleucină	1,4	1,9	+ 0,5
Valină	1,6	2,5	+ 0,9

Producerea colagenului comestibil se recomandă a se face din piele gelatină și, mai ales, din șpalt din piei de bovine de 10–20 kg bucata, complet decalcificate, aduse la pH≈5,6, apoi spălate cu detergent anionic, pentru îndepărtarea grăsimilor naturale și, în sfârșit, piclate.

Operațiile de decalcificare, spălare și piclare, se recomandă a se efectua în butoaie de oțel inoxidabil, care sunt acceptabile din punct de vedere bacteriologic, rezultând piei cu gust bun și fără miros.

Materialele colagenice de uz alimentar sunt de mult timp folosite. Dacă până în prima jumătate a secolului al XX-lea se folosea doar gelatina, în prezent, au multiple aplicații și colagenul solubilizat, hidrolizatele și fibrele de colagen.

La producerea materialelor colagenice pentru industria alimentară se folosesc mai ales pieile de bovine, porcine și pești [357].

Materialele colagenice de uz alimentar nu trebuie contaminate cu agenți chimici toxici, microorganisme, și să conțină minerale și combinații organice sintetice care să se încadreze în normativele FAO.

Materialele colagenice se utilizează ca ambalaje alimentare, ingrediente alimentare, agenți de limpezire și suporturi pentru enzime imobilizate.

Ambalajele alimentare constau din *folii*, *tuburi* și *plase* pentru care se folosesc *pastele de colagen* obținute din fibre de colagen sau colagen solubilizat și din soluții de colagen solubilizat.

Mașele artificiale sau învelișul tubular pentru mezeluri se prezintă în comerț sub formă de role uscate, cu lungimea de 25–30 m și cu diametre de 10–200 mm.

Materia primă pentru obținerea mașelor artificiale pentru mezeluri o constituie pieile de bovine de 20–25 kg bucata, de foarte bună calitate. După cenușărirea cu var și sulfură de sodiu, se șerveiesc, apoi se șpăluiesc pe toată

suprafața. Șpaltul de față trebuie să rezulte cât mai subțire și se prelucrează pentru pielea finită, iar șpaltul de carne servește pentru mașele artificiale.

Șpaltul pentru mașele artificiale se supune unei postcenușării de 50–60 zile cu o suspensie de var, se decalcifică apoi complet, se mărunțește în bucăți de 5 x 5 cm și se defibrează într-o moară cu discuri la temperatura de 5–10°C.

În urma măcinării rezultă o pastă cu o consistență de 3,5–3,8% formată din fibre foarte fine, cu un grad de măcinare de 90°Sh și un indice de polidispersitate dimensională, $\sigma_e < 0,8$. Pasta se rafinează, apoi se acidulează cu acid clorhidric și acid lactic, astfel ca după o maturare de 12–24 ore la temperatura de 4°C să fie la pH=2,5–3,5.

În timpul maturării se produce o reconstituire a colagenului, o stabilizare a structurii pastei, care este evidențiată prin creșterea vâscozității. Forma tubulară se realizează prin extrudare printr-o filieră inelară, direct în baia de coagulare, care este frecvent constituită dintr-o soluție concentrată de sulfat de sodiu și sulfat de amoniu (1,5–2,5M în amestec).

Aceeași soluție de precipitare se pulverizează și în interiorul tubului. Din baia de coagulare tubul de colagen trece printr-o baie de spălare, o baie de tăbăcire și o baie de plastifiere.

Ca agenți de tăbăcire se folosesc aldehida glutarică, aldehida formică, clorura ferică, iar ca agenți de plastifiere, în primul rând, glicerina. Tubul de colagen astfel tratat, în stare umflată, este supus uscării într-o cameră în care are loc o circulație intensă a aerului la temperatura de 22–26°C [358, 359].

Majoritatea aplicațiilor materialelor colagenice pentru uz alimentar se bazează pe proprietatea lor de gelatinizare. Ele servesc pentru reglarea vâscozității, ca agent de gelatinizare, ca emulgator, ca liant etc.

Gelatina are cea mai mare utilizare. Temperatura, viteza de gelatinizare și rigiditatea gelatinelor se reglează cu unii auxiliari cum sunt: amidonul, pectina, guma arabică. Prin adăugarea de 0,5% clorură de sodiu, scade rigiditatea și temperatura de gelatinizare. Gelatina se folosește ca mediu de microcapsulare pentru diferite arome și produse antiseptice [360].

Gelatina alimentară și fotografică. Gelatina se obține din deșeuri de piele gelatină sau piele tăbăcită în crom și din oase. Ea are proprietatea de transfor-

mare reversibilă sol–gel, proprietate pe care se bazează formarea filmelor, utilizarea în industria alimentară, înclieirea hârtiei, apretarea textilelor, pastilarea și încapsularea medicamentelor.

Gelatina joacă rol de coloid protector la prepararea produselor cosmetice, farmaceutice, emulsiilor fotografice sau ca agent de floculare, la flotarea mineurilor.

Soluțiile de gelatină, chiar în concentrații mici, au vâscozitatea ridicată. Din punct de vedere chimic, gelatina este o substanță macromoleculară formată din lanțuri polipeptidice, din cele trei lanțuri ale macromoleculei de colagen, care pot fi întregi sau aproape întregi. Masa moleculară medie a gelatinei este de 70000–90000. Transformarea colagenului în gelatină înseamnă trecerea de la o structură organizată de colagen insolubil la o structură mai puțin organizată de gelatină solubilă în apă.

Obținerea gelatinei din deșeuri de piele gelatină sau oase se poate face prin două procedee de fabricație distincte:

- procedeul alcalin de pretratament al materialului colagenic, în cursul căruia au loc transformări fizice și chimice, obținându-se gelatină cu punctul izo-electric la valori ale pH-ului de 4,7–5,2.

- procedeu acid de pretratament, aplicat mai ales la deșeurile de piele de porc, în urma cărora se obține gelatină cu punctul izoelectric la valori ale pH-ului de 7,5–9,0.

Schema fluxului tehnologic de obținere a gelatinei prin tratamentul alcalin este ilustrată în figura 12.71 [361].

Gelatina de cea mai bună calitate, pentru scopuri farmaceutice și fotografice, trebuie să aibă proprietăți fizice superioare (punct de congelare, vâscozitate, tăria gelului) și înaltă puritate chimică și bacteriologică (absența metalelor grele, a substanțelor reducătoare și oxidante, a germenilor gelatinolitici și patogeni).

În vederea obținerii gelatinei alimentare din deșeuri de piele tăbăcite în crom, acestea se supun unui postcenușar, timp de 120 de zile, apoi se spală intens cu apă și se tratează cu 1% sulfat de magneziu timp de 24 ore.

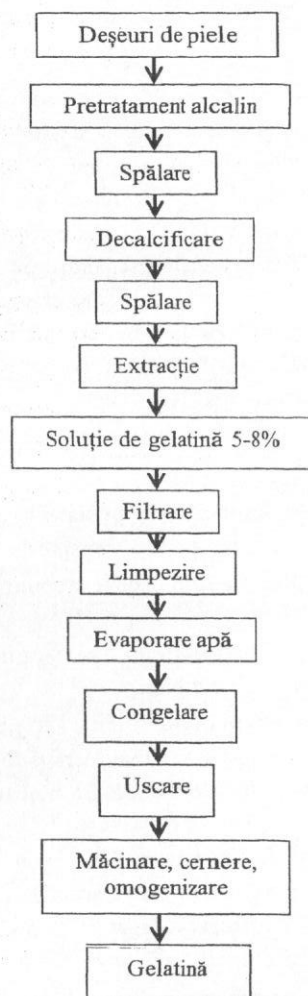


Fig.12.71. Schema fluxului tehnologic de obținere a gelatinei prin tratamentul alcalin

Sulfatul de magneziu se transformă în prezența hidroxidului de calciu în sulfat de calciu și se formează hidroxid de magneziu.

Hidroxidul de magneziu împiedică trecerea cromului din piele în soluția de gelatină. Deșeurile de piele cu 300–400% apă se încălzesc la temperatura de 70°C și se extrage gelatina. Gelatina obținută conține până la 0,5% crom, ceea ce face să nu poată fi întrebuințată în alimentație.

Suporturi pentru imobilizarea de enzime. Printre realizările din ultimul timp a biotehnologiilor, se regăsește bioreactorul pe bază de enzime imobilizate [362]. Materialele colagenice folosite la imobilizări de enzime se pot produce sub formă de fibre, granule, membrane etc. din colagen nativ solubil, colagen solubilizat și gelatină.

Dintre enzimele imobilizate pe materialele colagenice în biotehnologiile din industria alimentară sunt: α -amilaza, catalaza, glucoxidaza, diverse proteaze și lipaze.

Agenți de limpezire. Pentru clarificarea vinurilor, a berii, a unor produse rezultate din mere se pot utiliza gelatinele și colagenul solubilizat. Are loc o floculare datorită precipitării care se produce între derivații hidroxilfenolici ce se formează în procesele de fermentație și compuși colagenici.

12.16.3.3. MATERIALE AUXILIARE PENTRU PRELUCRAREA PIEILOR

Materiale de umplere–retanare și hidrofobizare. Pentru creșterea plinătății anumitor sortimente de piei, se utilizează materiale auxiliare, dintre care unele conțin materiale colagenice modificate sau în amestec, mai ales cu latexuri de polimeri acrilici: hidrolizate de colagen grefate cu monomeri acrilici, hidrolizate de colagen acilate [363–365], hidrolizate de colagen în amestec cu copolimeri acrilici [366, 367], hidrolizate de colagen modificate și polielectroliți macromoleculari și sintetici [368].

Agenții de hidrofobizare au, în structura lor, funcții hidrofobe constituite din resturi alifaticе cu peste 12 atomi de carbon sau resturi aromatice.

Dintre materialele de hidrofobizare colagenice, se menționează gelatina, hidrolizatele de colagen, în formă simplă sau modificată, precum și sub formă

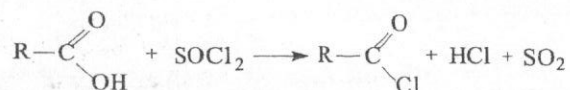
de compozite. Un astfel de material compozit constă dintr-un amestec de hidrolizat de colagen modificat chimic prin acilare cu clorură de benzoil [364, 365].

Auxiliari pentru finisarea pieilor. Finisajele pieilor cu pelicule de acoperire pe bază de cazeină, din motive economice, pot fi înlocuite cu pelicule pe bază de hidrolizate de colagen grefate cu monomeri acrilici, hidrolizate de colagen hidrofobizate [369 – 373] sau hidrolizate de colagen reactive [374, 375].

Hidrolizatele de colagen hidrofobizate prin acilare cu un amestec de clorură de benzoil, anhidridă ftalică sau anhidridă maleică și esterificare cu clorură de benzil au o proprietăți de pelicologeni foarte apropiată de ale cazeinei.

12.16.3.4. UTILIZĂRI DIVERSE

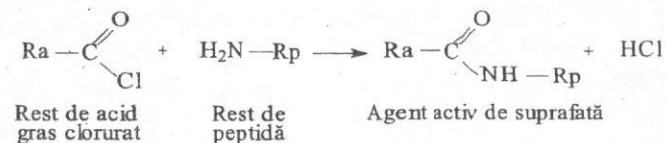
Agenți activi de suprafață pe bază de hidrolizate de colagen și acizi grași clorurați. Acizii grași sub formă topită, la temperatura de 50–55°C, sunt tratați într-un vas de reacție cu clorură de tionil, timp de 30–120 min, după care se obține un lichid de culoare brună:



Reacția de clorurare se poate realiza și cu alți agenți: tri- și pentaclorură de fosfor, oxiclurură de fosfor, clorură de sulfură etc. În funcție de natura agentului de clorurare, de puritatea acidului gras și de condițiile de reacție, clorurarea se poate desfășura până la randamente de 85%.

Raportul molar între clorura de tionil și acizii grași este de 1,5 : 1.

Clorurile acizilor grași reacționează, cu ușurință, în mediu alcalin, cu grupele bazice ale peptidelor:



Pentru obținerea unor produși tensioactivi cu proprietăți corespunzătoare se utilizează hidrolizate cu mase moleculare mici, de 400–700.

Raportul molar clorură acidă/peptidă este de 1:1, considerând masa moleculară medie ca fiind de 500.

Practica a dovedit că este necesar un exces de clorură acidă, care poate ajunge până la 70%. Reacția este exotermă și pentru un randament optim, se recomandă temperatura de 50–55°C. La cuplare, pH-ul de reacție este mai mare de 7 și se recomandă a se începe cu pH=10, apoi pe parcursul desfășurării reacției, acesta scade treptat până la pH=7,0–7,5.

Produsul de reacție se prezintă sub forma unei dispersii vâscoase, care se dizolvă în apă, este stabil la duritatea apei și este biodegradabil. Se poate utiliza în industria textilă și de pielărie.

Poli-α-aminoacizi. Poli-α-aminoacizii pot servi la obținerea de pelicule de uz medical, produse pelicologene pentru finisarea pieilor, fibre și fire. Pentru toate aceste utilizări poli-α-aminoacizii trebuie să se comporte ca pelicologeni.

Poli-α-aminoacizii sunt polimeri obținuți din α-aminoacizi sau peptide, prin formarea de legături peptidice de cuplare.

Pentru a se asigura formarea unui polimer liniar, grupele carboxilice și α-aminice terminale, trebuie să fie libere, iar toate celelalte funcții chimice ale macromoleculelor, situate în poziție laterală, să fie blocate cu grupe de protecție reversibile.

În principiu, formarea unei legături peptidice presupune eliminarea unei molecule de apă între grupa carboxilică și grupa aminică provenite de la două resturi de aminoacizi. Etapele de formare a legăturii peptidice sunt următoarele:

- blocarea funcțiilor chimice neparticipante la cuplare;
- activarea grupei carboxilice sau aminice;
- cuplarea aminoacizilor;
- deblocarea funcțiilor chimice protejate.

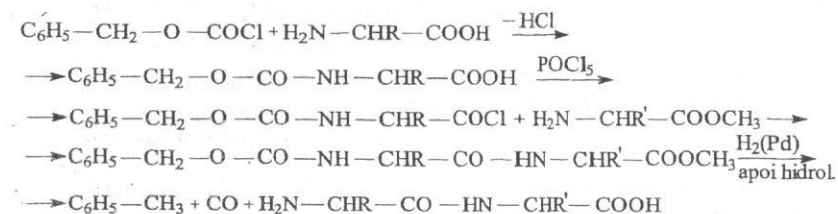
Grupele de protecție a funcțiilor chimice neparticipante la cuplare trebuie să fie ușor îndepărtate, să nu ducă la reacții secundare și să fie selective față de anumiți agenți de clivare.

Grupele de protecție mai importante pentru grupa α -aminică sunt benzil-oxycarbonil și aril-sulfenil.

Grupa benziloxycarbonil poate fi introdusă printr-o reacție clasică de acilare, folosind clorura de benziloxycarbonil în mediu apos. Posibilitățile de clivare ale grupei sunt: sodiu metallic în amoniac lichid, HCl în metanol și prin acțiunea radiațiilor ultraviolete.

Grupa benziloxycarbonil are dezavantajul că este instabilă la agenții alcalini, care se folosesc la hidroliza esterilor metilic și etilic și a aminoacizilor și manifestă tendința de a forma N-carboxianhidridele aminoacizilor respectivi.

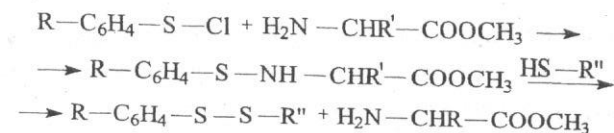
Îmbunătățirea selectivității grupei benziloxycarbonil față de anumiți agenți de clivare s-a realizat prin introducerea diversilor substituenți în nucleul benzenic: halogeni, nitro și metoxi.



S-au utilizat și alte grupe de protecție ale funcției α -aminice din clasa compușilor cu structuri de tip uretan: terț-butiloxycarbonil, terț-amilocarbonil și 2-izopropilcarbonil.

Grupa aril-sulfenil poate fi introdusă ca grupă de protecție la grupa α -aminică prin reacția clorurii de sulfenil ca săruri sau esteri ai aminoacizilor. Îndepărtarea grupei de protecție se face cu acizi minerali slabi, acid tioglicolic și tiofenol. Când nucleul benzenic are substituenți care atrag electroni, îndepărtarea se face mai ușor.

Schema reacțiilor de introducere și clivare a grupei aril-sulfenil este următoarea:



Grupele de protecție pentru grupa carboxil, care au o aplicabilitate mai largă sunt: esterii metil și etil și esterii benzilici.

Esterii metil și etil ai aminoacizilor se prepară prin introducerea de HCl gazos într-o suspensie de aminoacizi realizată în metanol sau etanol și încălzirea sistemului la temperatura de fierbere a alcoolului sau prin folosirea clorurii de tionil adăugată într-o suspensie alcoolică de aminoacizi.

Scindarea grupelor metoxi sau etoxi se face prin hidroliză alcalină. Se mai pot folosi tratamente cu HCl în soluție apoasă de acetonă sau cu halogenuri de litiu în piridină.

Dezavantajele acestor grupe de protecție sunt date de reacțiile de racemizare care apar în timpul clivării și de caracterul nespecific al scindării în prezența grupelor de protecție α -aminice sensibile la alcalii.

Esterii benzilici se obțin prin reacția aminoacidului liber cu alcoolul benzilic, în prezența catalizatorilor acizi: acid clorhidric, acid polifosforic, acid benzensulfonic și p-toluensulfonic. Apa formată în timpul reacției se îndepărtează prin distilare azeotropă. Clivarea esterilor benzilici se poate face prin hidrogenarea catalitică cu acid bromhidric în acid acetic glacial și cu sodiu metallic în amoniac lichid.

Esterii terțbutilici se obțin prin tratarea aminoacizilor sau a peptidelor cu izobutan și acid sulfuric. Acești esteri sunt stabili la hidrogenarea catalitică și la hidroliza alcalină. Ei sunt clivați, prin tratare cu acid bromhidric, în acid acetic glacial și cu acid trifluoracetic.

La sinteza peptidelor și a polipeptidelor, pentru a se înlătura posibilitatea producerii reacțiilor secundare, ca urmare a participării grupelor resturilor laterale ale aminoacizilor sau peptidelor, este necesară blocarea temporară a acestor grupe.

Funcția ϵ -aminică a lizinei se poate bloca prin tratarea cu trifluoracetat de etil sau cu derivați benziloxycarbonil de Cl, CN, NO₂.

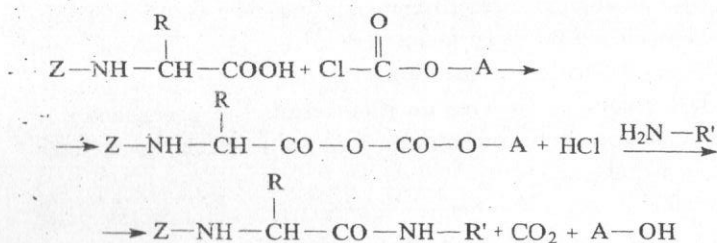
Blocarea are loc în prezența sărurilor de cupru, care sunt capabile să realizeze o mascare a grupei α -aminice. Clivarea acestor grupe se poate realiza cu ajutorul acidului trifluor-acetic sau prin hidrogenarea catalitică.

Grupele β - și γ -carboxilice se pot bloca prin formarea esterilor metilic sau etilic, prin deschiderea ciclului N-benzil-oxycarbonilaspartic sau glutamic cu alcoolii corespunzători, iar gruparea carbonil rămasă liberă, se transformă în ester terțbutilic.

Formarea legăturilor peptidice se poate realiza pe multe căi folosind activarea carboxilică sau aminică. Dintre metodele care permit obținerea polipeptidelor cu lungimi mari se menționează: metoda anhidridei mixte, a azidei, a carbodiimidei și sinteza în fază solidă.

Metoda anhidridei mixte presupune formarea intermediară a unui compus între aminoacid și un „partener acid”, care ulterior se va cupla cu o altă moleculă de aminoacid. Reacția de cuplare are loc în prezența unei baze organice, cea mai frecvent folosită fiind trietilamina.

Schema reacției de cuplare este următoarea:



în care: Z este grupa de protecție a funcției α -aminice, A este restul partenerului acid și R, R' sunt resturi de aminoacizi.

Metoda azidei se desfășoară în condiții optime la temperatura de 0°C, pH=1-2, în solvenți aprotici dipolari (DMF, DMSO).

Metoda carbodiimidei folosește frecvent drept reactiv de cuplare NN'-diciclohexilcarbodiimida, care este puternic reactivă, însă diciclohexilureea care se formează nu poate fi complet îndepărtată din masa de reacție.

Metoda sintezei în fază solidă se bazează pe atașarea unui suport polimeric, insolubil, la restul C-terminal al unui aminoacid sau peptidă și extinderea lanțului prin aditii succesive de noi aminoacizi sau peptide. După fixarea la suport a primului rest de aminoacid sau peptidă, asamblarea în continuare se poate face prin una din metodele de cuplare cunoscute.

După ce asamblarea a fost terminată, peptida este îndepărtată de pe suportul polimeric.

Masa moleculară medie a poli- α -aminoacizilor poate să depășească cu mult pe cea a tropocolagenului și ea depinde de natura reactivilor de cuplare, de condițiile de reacție etc.

Adezivi. Materialele colagenice au proprietăți adezive datorită numărului relativ mare de grupe polare pe care le posedă și vâscozității soluțiilor lor apoase. Adezivii colagenici sunt adecvați mai ales pentru materialele polimerice polare ca: hârtia, lemnul, pielea, textilele, în scopuri medicale [376].

Adezivii colagenici se găsesc singuri în multe produse sub formă de soluții sau dispersii apoase sau în amestecuri cu alți polimeri ca polizaharide, alcool polivinilic, poliacrilati, rășini fenolformaldehidice, rășini ureoformaldehidice, proteine vegetale etc.

Substanțele tensioactive sunt formate din hidrolizate de collagen hidrofobizate cu resturi alifatic, utilizate ca detergenți, stabilizatori de suspensii anorganice, stabilizatori de spumă [377], emulgatori pentru obținerea latexurilor de polimeri sintetici etc.

Alte utilizări. Materialele colagenice sub formă de hidrolizate de collagen rezultate din deșeuri de piele netăbăcită mai puțin valoroase, în amestec cu vitamine, microelemente anorganice se folosesc în hrana animalelor (porcine, bovine, păsări). Acestea se cunosc sub denumirea de *făină proteică furajeră*.

Compozite pe bază de gelatină și polimeri sintetici se folosesc la producerea membranelor semipermeabile, utilizate pentru diferite separări în tehnologie [378].

Hidrolizate de collagen și gelatină se utilizează ca materiale de îngroșare pentru lacri, vopsele, apreturi textile.

Hidrolizatele de colagen din deșeurile de piele netăbăcită puțin valoroase și din deșeurile de piele tăbăcită, sub formă lichidă sau sub formă de pulbere, se folosesc în agricultură, unde se valorifică conținutul lor în azot la fertilizarea solurilor.

12.17. FIBRELE RETICULARE SAU RETICULINA

Fibrele reticulare sau reticulina constau din rețele, ca niște plase suport, compuse din fibre fine de colagen tip III.

Acestea constituie o componentă importantă a structurii organelor limfoide, ca de exemplu, măduva osoasă, timusul, ganglionii limfatici, splina, țesuturi limfoide organizate, asociate cu suprafețele mucoase, dar și în vasele sanguine, ficat și, în general, în structura organelor interne, derm etc. În derm sunt prezente, mai ales, în stratul reticular și în jurul părului și a glandelor sudoripare și sebacee.

Termenul de reticulină este atribuit de M. Siegfried [381]. În acea vreme termenul de reticulină era folosit pentru a descrie două structuri: structuri colorate cu argint prezente în membranele bazale și fibre asemănătoare histologic prezente în țesutul conjunctiv în curs de dezvoltare [379, 380].

Foarte adesea fibrele reticulare sunt combinate cu unul din zaharurile: glucoză, galactoză, manoză sau fucoză [380].

Fibrele reticulare sunt primele fibre ale țesutului conjunctiv care apar în embrion și sunt destul de abundente la noul născut.

În figura 12.72. este prezentat un țesut reticular care este format dintr-o rețea neregulată de fibre neelastice, foarte fine, care au însă multe asemănări cu fibrele elastice și de colagen.

În figura 12.73. se prezintă o rețea (argintată, neagră) din fibre foarte fine reticulare, care formează țesutul de sprijin (stroma) a unui nod limfatic. Celulele deschise la culoare sunt limfocitele, care se văd așezate în ochiurile dintre fibrele reticulare.

Fibrele reticulare au un rol însemnat de susținere în organele și țesuturile în care se găsesc. Ele sunt frecvent alături de colagenul tip I, mai rar alături și de alte tipuri de colagen, de exemplu, colagenul tip XII și de elastină.

Se găsesc în cantități minore, în comparație cu colagenul sau elastina.

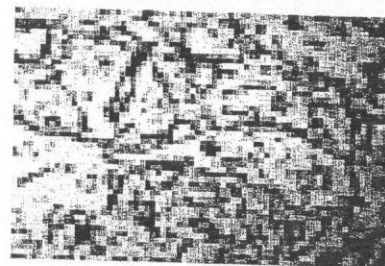


Fig.12.72. Țesut de fibre reticular

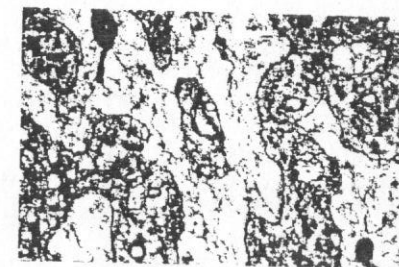


Fig.12.73. Țesut reticular într-un nod limfatic

Bibliografie

1. Lehninger A.L., Biochimie, Vol. I, II, Editura Medicală, București, 1987, 1992.
2. Nenițescu C.D., Chimie organică, Vol. I, II, Editura Didactică și Pedagogică, București, 1980.
3. Popescu A., Cristea E., Yamfirescu-Gheorghiu M., Biochimie Medicală, Editura Medicală, București, 1980.
4. Pauling L., General Chemistry, Third edition, W.H. Freedman and Company, San Francisco, 1970.
5. Chiriță Gh., Colagenul și utilizările sale, Editura Tehnică, București, 1981.
6. Booth B.A., Biochim. Biophys. Acta, 607, 145, 1980.
7. Rojking M., Bul. Rheum. Dis, 30, 1006, 1979-1980.
8. Booth B., Biochim. Biophys. Acta, 607, 145, 1980.
9. Dale B. A., Ling S. Y., Biochemistry, 18, 276, 1979.
10. Kreig I., Exp. Cell. Res., 125, 23, 1980.

11. Bornstein P., Kang A.H., Piez A., Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 55, 417.
12. Velican C., Velican D., *Organizarea macromoleculară a țesutului conjunc-tiv*, Editura Academiei Române, București, 1970.
13. Bohmer T., Acta Rheum.Scand, 17,209, 1971.
14. Risteli J., Truggvason K., Kivirikko K.I., Eur. J. Biochem, 73, 485, 1977.
15. Rich A., Crick F.H.C., J. Molec.Biol., 3, 483, 1961.
16. Fraser R.D.B., MacRae T.P., Suzuki E., J.Molec.Biol. 3, 463, 1979.
17. Procop B.N., Davies M., Ogstron A.G., Biochem J., 96, 449, 1965.
18. Holem J., Kivirikko K.I., Simons K., Biochim.Biophys. Acta, 198, 460, 1965.
19. Hutton J., Tapel A.L., Underfried S., Arch.Biochem, 118, 231, 1967.
20. Schwartz A., Andreis J. C., Walton A.G., Nature, 1970, 226, 161.
21. Traub W., Piez K.A., The Chemistry and Structure of Collagen, Advances Protein Chem., Acad. Press, New York, 1971.
22. Miller R.L., Ann. Biochem., 45, 202, 1972.
23. Chapman J.A., Biopolymers, 28, 1367, 1989.
24. Kretsinger R.H., Manner G., Gould B.S., Rich A., Nature, 202, 438, 1964.
25. Chapman J.A., Chapman J.H., Biopolymers, 21, 2291, 1982.
26. Speakman P.T., Nature, 229, 282, 1971.
27. Chiriță G., Trandafir V., Das Leder, 8, 139, 1973.
28. Manner G., Gould B.S., Biochem.Biophys.Acta., 130, 383, 1966.
29. Lees J.F., Bulleid N.J., J. Biol. Chem., 269, 24354, 1994.
30. Lees J.F., Buleid N.J., EMBO J., 16, 908, 1997.
31. Church R.L., Pfeiffer S.E., Proc. Nat. Acad. Sci., 68, 638, 1971.
32. Grants M.E., Procop D., J. New. Engl.Med., 286, 194, 1972.
33. Murphy W.H., Von der Mark K., Eneany L.S., Biochemistry, 14, 3242, 1975.
34. Uitoo J., Ann. Chem. Res., 99, 97, 1979.
35. Schorfield D., Uitoo J., Procop D., Biochem. Soc. Trans., 2, 90, 1974.
36. Piez A., Ann. Chem. Res., 37, 547, 1979.
37. Holmes D.F., Chapman J.A., Prockop D.J., Kadler K.E., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 89, 9855, 1992.
38. Kadler K.E., Hulmes D.J., Hojima Y., Prockop D.J., Ann. Nat. Acad. Sci., 580, 214, 1990.
39. Parry D.A.D., Craig A.S., Nature, 282, 213, 1979.
40. Merrilees M.J., Tiang K.M.M., Connect. Tissue Res., 16, 237, 1987.
41. Eikenberry E.F., Brodsky B., Int. J. Biol. Macromol., 4, 322, 1982.
42. Eikenberry E.F., Craig A.S., Int. Biol. Macromol., 4, 393, 1982.
43. Hulmes D.F., Capman J.A., Int. J. Biol. Macromol., 8, 161, 1986.

44. Trotter J.A., Thurmond F.A., Koob T.J., Cel.Tissue Res,275, 451, 1994.
45. Amari S.I., Nagaoka H., Methods of Information Geometry, Amer. Math. Soc. And Oxford University Press, 2002.
46. Galloway J., Structure of Collagen Fibrils, NATO ASI Ser., Ser. A., 93, 73, 1985.
47. Silver D., Miller J., Harrison R., Prockop D.J., Proc. Nat. Acad. Sci. USA (Biophysics), 89, 9860, 1992.
48. Smith J.W., Molecular Pattern in Native Collagen, Nature, 219, 157, 1968.
49. Fraser R.D.B., McRae T.P., Miller A., J.of Molec. Biol., 193, 115, 1987.
50. Neurath H., Hill R., The proteins, Vol. I, 2., Ed. Acad. Press, New York, 1979.
51. Schroder E., Lubke K., *Chemie und Biochemie der Amino-sauren, Peptide und Proteine*, Vol.1,2, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1975.
52. Seyer J.M., Biochemistry, 19, 1583, 1980.
53. Bornstein P., Piez K., Biochemistry, 5, 460, 1980.
54. Rojkind M., Blumenfeld O., Biochim.Biophys., 19, 1954, 1964.
55. Bailey J., Robins S.P., Frontiers of Matrix Biology, Vol. I, ed. Robert B., Basel, München, Paris, London.
56. Traub W., Piez K.A., *Advances in Protein Chemistry*, Acad.Press, New York, London, 243, 249, 254, 1971.
57. Condratov M., Badea N., Chiriță Gh., Rev.Ind Ușoară, 8, 245, 1977.
58. Cârsteanu M., Vlădescu C., *Colagenul – biochimie și fiziologie*, Ed. Acad. Române, București, 1982.
59. Linsanenmayer T.F., Cell Biology of Extracellular Matrix, 2nd ed., ed.by E.D. Hay, Plenum Press, New York, 1991.
60. Stryer L., Biochemistry, Freeman W.H. & Company ed., New York, 1989.
61. Mould A.P., Holmes D.J., Hulmes D.F., Cummings C., Sear C.H., Chapman J.A., J. Mol., 1990.
62. Parkinson J., Kadler K.E., Brass A., J.Mol. Biol., 247, 823, 1994.
63. Birk D.E., Linsenmayer T.F., Extracellular Matrix Assembly and Structure, ed. by P.D. Yurchenco, D.E. Birk, Acad. Press, New York, 1994.
64. Birk D.E., Hahn R.A., Linsenmayer C.Y., Matrix Biol., 15, 111, 1996.
65. Garcia-Ruiz J.M., Otalora F., Physica A, 178, 415, 1991.
66. Hulmes D.J., Bruns R.R., Gross J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 388, 1983.
67. Birk D.E., Nurminskaia M.V., Zycband E.I., Dev. Din., 202, 229, 1995.
68. Reich G., Collagen, Verlag Theodor Steinkopff, Drezda, 1966.
69. Chvapil M., Hurych J., Kozarstvi, J.A.L.C.A., 12, 293, 1962.

70. Mellon E.F., Viola S.J., Naghski J., J.A.L.C.A., 55, 622, 1960.
71. Bornstein P., Sage H., Ann. Rev. Biochem. 49, 957, 1980.
72. Prockop J.D., Kivirikko K.I., Tuderman L., J. N. Engl. Med., 301, 13, 1979.
73. Bruckner P., van der Rest M., Microsc.Res.Tech., 8, 374, 1994.
74. Hesse M., Engvall E., J. Biol.Chem., 259, 3955, 1984.
75. Kielty C.M., Boot-Handford R.P., Agad S., Biochem. J., 272, 787, 1992.
76. Van der Rest M., Mayene R., J. Biol.Chem., 263, 1615, 1988.
77. Fukai N., Suneel S.A., Olsen B.R., Methods in Enzimology, E. Ruoslati, E. Engvall eds., Acad. Press, San Diego, 1994.
78. Koch M., Laub F., Zhou P., Ahahn R., Tanaka S., Burgeson R.E., Gerecke D.R., Raminetz F., Gordon M.K., J. Biol. Chem., 18, 43236, 2003.
79. Piez K.A., Biochim. Biophys. Acta, 53, 596, 1961.
80. Bentley J.P., Jackson D.S., Biochim.Biophys. Acta, 107, 519, 1965.
81. Rexrodt F.W., Hopper K.E., Fietzek P., Eur.J.Biochem., 38, 384, 1973.
82. Witkop B., Advances in ptotein chemie, Acad. Press., New York, 1961.
83. Gross E., Witkop B., J.Biol. Chem., 237, 1856, 1962.
84. Hohmann T., Biochemistry, 3, 356, 1964.
85. Bornstein P., Piez K.A., Biochemistry, 5, 460, 1966.
86. Blumenfeld O.O., Gallop P.M., Biochemistry, 1, 947, 1962.
87. Gallop P.M., Seifter S., Meilman E., Nature, 183, 659, 1954.
88. Hörmann H. Leder, 11, 173, 1960.
89. Hörmann H., Joseph K.Th., Wilm H.Z., Physiol. Chem., 341, 248, 1965.
90. Dumitru I.F., Iordăchescu D., *Introducere în Enzimologie*, Ed. Medicală, București, 1981.
91. Dumitru I.F., Iordăchescu D., *Enzime*, Editura Medicală, bucurești, 1974.
92. Chiriță Gh., Chiriță M., *Pielea animală*, Editura Tehnică, București, 1993.
93. Fietzek P.P., Kell I., Kühn K., FEBS Lett, 26, 60, 1972.
94. Fietzek P.P., Rexrodt F.W., Wendt P., Stark M., Kühn K., Eur. J. Biochem., 30, 163, 1972.
95. Rauterberg J., Fietzek P.P., Rexrodt F.W., Becker V., Stark M., Kühn K., FEBS Lett, 21, 75, 1972.
96. Rauterberg J., et al., Eur. J. Biochem., 27, 231, 1972.
97. Rexrodt F.W., Hopper K.E., Fietzek P., Eur. J. Biochem., 38, 384, 1973.
98. Wendt P., Von der Mark, K., Rexrodt F.W., Eur. J. Biochem, 30, 169, 1972.
99. Ramachandran G.N., Nature, 177, 170, 1956.
100. Ramachandran G.N., Ambady G.K., Current Sci (India), 23, 349, 1954.
101. Ramachandran G.N., Kartha G., Nature, 174, 269, 1954.

102. Ramachandran G.N., Kartha G., Nature, 176, 593, 1955.
103. Veis A., *The Macromolecular Chemistry of Gelatine*, Academic Press., New York, London, 1964.
104. Cowan P.M., McGavin S., Nature, 176, 501, 1955.
105. Cowan P.M., McGavan S., North A.C.T., Nature, 176, 1062, 1955.
106. Bear R.S., J.Biophys.Biochem. Cytol., 2, 363, 1956.
107. Crick F.H.C., Rich A., Nature, 176, 780, 1955.
108. Rich A., Crick F.H.C., Nature, 176, 915, 1955.
109. Rich A., Crick F.H.C., in: Recent Advances in Gelatine and Glue Res. (G. Stainsby, ed.), Pergamon Press, New York, 1958.
110. Rich A., Crick F.H.C., J. Mol. Biol., 3, 483, 1961.
111. Ramachandran G.N., in: Intern. Rev. Conn. Tissue Res., 1, 127, 1967.
112. Ramachandran G.N., Lasieskharan V., Nature, 190, 1004, 1961.
113. Ramachandran G.N., *Treatise on Collagen*, Vol. 1.2., Acad. Press, New York, 1967.
114. Elden R.H., *Biophysical Properties of the Skin*, Vol. I, Wiley-Interscience a Division of John Wiley & Sons, Inc., New York, London, Sydney, Toronto, 1971.
115. Hollestein M., Das Leder, 3, 40, 1979.
116. Hörmann H. Leder, 3, 79, 1962.
117. Gregory R., Wise J.C., Sikes D., Vet. Med. Assoc., 125, 244, 1954.
118. Hendrickson J.B., Cram D., Hommond G.S., *Chimie Organică*, Ed. Științifică, București, 1976.
119. Gross E., Meienhofer H., Peptides, Vol. 1-3, Acad. Press, New York, 1979-1981.
120. Jakubke H.D., Jeschkelt H., Aminosauen, Peptide, Proteine, Verlag Chemie, Weinheim.
121. Drake M.P., Davidson P.F., Bump S., *Biochemistry*, 5, 301, 1966.
122. Latinen O., Nikila E., Kivirikko K., J.Acta Med.Scand., 179, 275, 1966.
123. Loeven N.A., Acta Physiol. Pharmacol. Neerl., 12, 350, 1963.
124. Bornstein P., Kang A.H., Piez K.A., in Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 55, 419, 1966.
125. Stary Z, in Handbuch der Haut und Geschlechtskrankheiten (Ed. Marchionini und Spier), Stuttgart, 1963.
126. Hörmann H. das Leder, 3, 79, 1962.
127. Rich A., Crick F.H.C., J. Mol. Biol., 3, 483, 1961.
128. Fraser R.D.B., McRae T.P., Suzuki E., J. Mol. Biol., 129, 469, 1979.
129. Balley A.J., Paul R.G., J.S.L.T.C., 3, 104, 1998.
130. Frank H.S., Wen W.Y., Disc. Faraday Soc., 24, 133, 1957.

131. Moldovan L., Oancea A., Radu G.I., *Colagenul, componentă proteică multifuncțională pentru obținerea de biomateriale*. Depart. Chimie analitică, Inst. Naț. pentru Științe Biologice, 2007.
132. Becker H., Berger W., Domsche G., Fanghänel E., Faust J., Fischer M., Gentz F., Gewald K., Gluch R., Mayer R., Müller K., Pavel D., Schmidt H., Schollberg K., Schwetlick K., Seiler E., Zeppenfeld G., *Organicum*, Ed. Științifică și Enciclopedică, București, 1982.
133. D'Arcy R.L., Watt I.C., in: *Trans Faraday Soc.*, 66, 1236, 1970.
134. Ward A.G., *Recent Advances in Food Science*, in *Food Res.*, ed. Butleworth, London, 1963.
135. Vincent P., Thomas E., Marris H., *Biopolymers* 12, 2423, 1972.
136. Incsecher M., Rüegg M., Schinder P., *Biopolymers*, 12, 2489, 1974.
137. Colț M., Bucevski M.D., *Valorificarea neconvențională a pieilor*, Editura Gh. Asachi, Iași, 1999.
138. Grassman W., Kühn K., *Z-Physiol.Chem.* 1, 301, 1975.
139. Heidemann E., Fridrich G., Heinrich W., *Das Leder*, 20, 93, 1969.
140. Scroggie I.G., *J.A.L.C.A.*, 64, 628, 1969.
141. Marooka T., Norimoto M., *J.Appl. Polym.Sci.*, 38, 849, 1989.
142. Bianchi E., Como G., Ciferri A., Puett D., Rajagh L.V., *J. Biol. Chem.*, 242, 1361, 1967.
143. Flory P.J., *Principles of Polymers Sci.*, 21, 141, 1967.
144. Rajagh L.V., Puett D., Ciferri A., *Biopolymers*, 1965, 3, 1965.
145. Mihailov A.N., *Himia i Fizika Kollagena Kojnovo Pokrova*, Legkaia Industria, Moskva, 1980.
146. Herbage D., Hanus A., Vallet G., *Biochim. Biophys. Acta*, 168, 544, 1968.
147. Herbage D., Huc A., Vallet G., *Biochim. Biophys. Acta*, 194, 325, 1969.
148. Harraps B.S., *Int. Prot. Res.*, 1, 245, 1969.
149. Heldmann E., Nill H.W., *Kolloid. Y.*, 232, 674, 1969.
150. Russel A.E., Cooper D.R., *Biochemistry*, 8, 3980, 1969.
151. Russel A.E., Cooper D.R., *Biochemistry*, 9, 2802, 1970.
152. Russel A.E., Cooper D.R., *J.S.L.T.C.*, 54, 417, 1970.
153. Erlander S.R., *Macromol. Sci.*, A 2, 595, 1968.
154. Fraser R.D.B., Mac Rae T.P., *Keratins*, Ed. Thomas Spriengfield, Vol.III, 1972.
155. Drake M.P., Veis A., *Biochemistry*, 3, 185, 1964.
156. Tămaș V., *Biochimie animală*, Editura Didactică și Pedagogică, București, 1975.
157. Piez K., *Biochem. Biophys. Acta*, 53, 596, 1961.

158. Vuust A.R., Piez K.A., *J. Biol. Chem.*, 247, 856, 1972.
159. Abernethy J.L., *J.of Chem.Education*, 44, 364, 1967.
160. Heidemann E., *Das Leder*, 2, 33, 1978.
161. Whitaker R.E., *J.S.L.T.C.*, 59, 172, 1975.
162. Chiriță Gh., Chiriță A., Chiriță M., *Tratat de Tehnologia Pieilor și Blănușilor*, Vol. I și II, Editura Gh. Asachi, Iași, 1999.
163. Cârsteanu M., Vlădescu C., *Colagenul, biochimie și fiziologie*, Editura Academiei Române, București, 1982.
164. Mitchell W.M., Harrington W.E., *J. Biol. Chem.* 243, 4685, 1968.
165. Kühn K., Engel J., Zimmermann B., *Arch. Biochem. Biophys. Acta*, 105, 387, 1964.
166. Hafer R., Hörmann H., Hoppe Seiler's, *Z. Phziol. Chem.* 169, 330, 1963.
167. Bornstein P., Kang A., Piez K.A., *Biochemistry*, 5, 803, 1966.
168. Bornstein P., Von Mark K., Wyke A.W., *J. Biol. Chem.*, 2, 808, 1972.
169. Martin G.R., Piez K.A., Lewis M.S., *Biochem. Biophys. Acta*, 63, 472, 1966.
170. Chiriță Gh., Ciobanu A., *Rev. Ind. Ușoară*, 10, 18, 1971.
171. Flausch A., *Technicuir*, 10, 173, 1979.
172. Ward A.G., Courts A., *The Science and Technology of Gelatine*, Acad. Press., New York, 1977.
173. Flory P.J., Weaver E.S., *J.A.C.A.*, 82, 4518, 1960.
174. xxx Brevet USA, nr. 2384673, *Extraction of Glue and Gelatine*.
175. Glatzer A.N., Delange R.J., Sigman B.S., *Chemical Modifications of Proteins*, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, 1988.
176. Spande T.F., Wikop B., *Advances in Protein Chemistry*, Vol. 24, Academic Press, New York, 1970.
177. Dumitriu S., Popa M., *J. Bioactive and Compatible Polymers*, 4, 151, 1989.
178. De Keghel M., *Traité Generale de la Fabrication des Colles*, Ed.Gauthier-Villars, Paris.
179. Bucevski M.D., Chiriță Gh., *Rev.Ind. Ușoară*, 9, 387, 1981.
180. Bucevski M.D., Chiriță Gh., *Rev. Ind Ușoară*, , 4, 206, 1983.
181. Bucevski M.D., Chiriță Gh., Mingesz M., Szarossy I., Gogean V., Suciu I., *Al II-lea Simpozion de Chimia și Tehnologia Pieilor, Blănușilor și Inlocuitorilor de Piele*, Iași, Vol. II, 1, 1980.
182. Bucevski M.D., Chiriță Gh., Caloianu-Iordăchel M., *Al III-lea Simpozion Național de Chimia și Tehnologia Pieilor*, Iași, Vol. II., 12, 1983.

183. Bucevschi M.D., Chiriță Gh., Mingesz M., Al IV-lea Simpozion de Chimia și Tehnologia Pieilor, Iași, vol. I., 375, 1986.
184. Chiriac L., Colț M., Deselnicu V., Bucevschi M.D., Bocu V., Simpozion Jubiliar CERPI, București, 4, 1996.
185. Deselnicu V., Albu L., Bucevschi M.D., Colț M., Chiriac L., I.U.L.T.C.S., Londra, 322, 1997.
186. Xi T., Xi B., J. Biomat. Applic., 7, 61, 1992.
187. Henidemann E., Fundamentals of Leather Manufacturing, Eduard Roether K.G., Darmstadt, 1993.
188. Träubel H., Das Leder, 32, 165, 1981.
189. Ying L., Scholnick F., Fearheller S.H., J.A.L.C.A., 78, 85, 1990.
190. Woordrof E.A., Tissue Heartvalves, ed. Butterworth, London, 1979.
191. Buch W.S., Kosek J., Angell W.W., J. Thorac Cardiovasc Surg. 60, 673, 1970.
192. Chiriță Gh., Chisăliță D., J.A.L.C.A., 8, 369, 1971.
193. Bartolotti U., Milano A., Mazzuco A., J. Thorac Cardiovasc. Surg., 84, 451, 1982.
194. Woordrof E.A., J. Bioeng., 2, 1, 1978.
195. Chiriță Gh., Bucevschi M.D., Bul. I.P.Iași, XXXII, fasc. 1-4, 1986.
196. Bucevschi M.D., Chiriță Gh., Roșu G., Al II-lea Simpozion Național de Piele și Înlocuitori de Piele, Iași, Vol. I., 393, 1980.
197. Bucevschi M.D., Chiriță G., Spigel E., Al III-lea Simpozion Național de Chimia și Tehnologia Pieilor, Blănușilor și Înlocuitorilor de Piele, Iași, Vol. I., 46, 1983.
198. Khor E., Biomaterials, 18 (2), 95, 1997.
199. Chen C.S., Yannas I.V., Spector M., Biomaterials, 16(10), 777, 1995.
200. Esposito E., Cortesi R., Nastruzzi C., Biomaterials 17(20), 2003, 1996.
201. Moczar M., et al., ASAIO J., 40, 697, 1994.
202. Tu R., La C.L., Thyagarajan K., J. Biomed. Mater. Res., 3, 27, 1993.
203. Loke W.K., Khor E., Wee A., Teoh S.H., Chian K.S., Biomaterials, 17, 2163, 1996.
204. Nashef A.S., US Patent 4.481 009, 1984.
205. Heijmen F.H., du Pont J.S., Middelkoop E., Kreis R.W., Hoekstra M.J., Biomaterials, 18(10), 749, 1997.
206. Vizárová K., Bakos D., Rehakova M., Macho V., Biomaterials 15(13), 1082, 1994.
207. Wang M.C., Pins G.D., Silver F.H., Biomaterials, 15(17), 507, 1994.
208. Fachsbauer H.L., et al., Biomaterials, 17(15), 1481, 1996.

209. Mureșianu E., *Tehnici de histochimie normală și patologică*, Editura Ceres, București, 1976.
210. Piez K.A., Bornstein P., Lewis M.S., Martin G.R., *Structure and Function of Connective and Skeletal Tissue*, Eds., Butterworths, London, 1965.
211. Piez K.A., et al., Biochim. Biophys. Acta, 53, 596, 1961.
212. Piez K.A., Eigner E.A., Lewis M.S., Biochemistry, 2, 58, 1963.
213. Fessler J.H., Biochem. J., 76, 452, 1960.
214. Fessler J.H., Biochem. J., 76, 463, 1960.
215. Herkness R.D., Marko A.M., Muir H., Neuberger A., Biochem J., 56, 554, 1974.
216. Katechaiski E., et al., *Aspects of Protein Structure*, Academic Press, London, 1963.
217. Bohmer T., in Acta Rheum. Scand., 17, 209, 1971.
218. Schröder E., Müller G., *Polymer Characterization*, Hanser Publishers, Munich, 1988.
219. Utrachi L.A., *Polymer Alloys and Blends*, Hanser Publishers, Munich, 1989.
220. Volintiru T., Ivan G., *Introducere în Fizico-Chimia Polimerilor*, Editura Tehnică, București, 1980.
221. Chiriță Gh., Bucevschi M.D., Al III-lea Simpozion Național de chimia și Tehnologia Pieilor, Blănușilor și Înlocuitorilor de Piele, Iași, Vol.I., 65, 1983.
222. Coleman B.D., Markowitz H., Noll W., *Viscozimetrie Flows of non-Newtonian Fluids*, Berlin Springer Verlag, 1966.
223. Trandafir V., Chiriță Gh., Rev. Ind. Ușoară, 3, 141, 1972.
224. Trandafir V., Rev. Ind. Ușoară, 3, 102, 1979.
225. Bolt R., Kerol D., Deistvie, *Radiații na organiceskie materialî*, Izdatelstvo Mir, Moskva, 1965.
226. Bailey J., Radiation Res. 31, 208, 1967.
227. Bailey J., Tromans J., Radiation Res., 23, 145, 1964.
228. Lonsdale-Eccles, J.D., Linley A.M., Dale B.A., Biochem.J., 197, 591, 1981.
229. Lonsdale-Eccles J.D., Hanfen J.A., Dale B.A., J. Biol. Chem, 255, 2235, 1980.
230. Lonsdale-Eccles J.D., Teller D.C., Dale B.A., Biochemistry, 21, 5940, 1982.
231. Linley A.M., Dale B.A., J. Invest. Dermatol., 78, 360, 1982.
232. Trandafir V., Chiriță Gh., Revue Techn. Des Ind. Du Cuir, 5, 149, 1975.
233. Eastoe J.E., Treatise on Collagen, ed. Ramachandran G.N., 1967.

234. Chiriță Gh., Chiriță M., Colț M., Mathe E., Rev. Ind. Ușoară, 4, 151, 1990.
235. Partridge S.M., Adv. Protein Chem., 17, 227, 1962.
236. O'Flaherty F., *The Chemistry and Technology of Leather*, Krieger R.F., Publishing Co., Florida, 1978.
237. Cassel J.M., Mandelkern L., Roberts D.E., J.A.L.C.A., 57, 556, 1962.
238. Wood G.C., Keech M.K., Biochem J., 75, 588, 1960.
239. Wood G.C., Biochem. J., 84, 429, 1960.
240. Keech M.K., Biophys. Biochem. Cytol., 9, 193, 1961.
241. Toole B.P., Lowther D.A., Biochem. J., 109, 857, 1968.
242. Țilenschi S., *Chimie Coloidală*, Editura Tehnică, București, 1964.
243. Chiriță M., *Biopolimeri și compozite naturale*, Editura Tehnică-Info, Chișinău 2001.
244. Chiriță M., *Biomateriale, implantologie și protezare medico-chirurgicală*, Editura Ștef, Iași, 2002.
245. Andradý A.L., Hamid S.H., Hu X., Torikai A., J. Photochemistry and Photobiology B: Biology, Vol.46, 1-3, 96, 1998.
246. Rittié L., Fisher G.J., Ageing Res. Review, Vol. I, IV, 705, 2002.
247. Sionkowska A., et al., Polymers, Vol.46, 6, 379, 2001.
248. Sionkowska A., Kaminska A., Internat. J. of Biological Macromolecules, Vol. 24, 24,4, 337, 1999.
249. Sionkowska A., J. Photochem. and Photobiol B: Biology, Vol.82, 9, 2006.
250. Bailey A.J., in Internat. Res. Connective Tissue Res.(ed. Hall D.A., Jackson D.S.), Acad. Press, New York, London, Vol.6, 5.
251. Piez K.A., Gross J., Biol. Chem. 255, 995, 1960.
252. Braams R., Intern. J. Rad. Biol. 4, 27, 729, 1963.
253. Dancewicz A.M., Majevska M., Biocim. Pol. Acta, 18, 283, 1971.
254. Mazanowska A., Dacewicz A.M., Sixteenth annual meeting of the European Society for Radiation Biology, 1981.
255. Gerber G.B., 6 th Intern. Congress of Radiation Biology, Tokio, 1970.
256. Pickerell J.A., Dorothy V., Marris F., Rad. Res., 62, 133, 1975.
257. Fisher G.J. Kang S., Zanzsauero J.V., Csorgo B., Yinsheng W., Datta S., Voorhees J., J.Arch.Dermatol., 138, 1462, 2002.
258. Torikai A., Shiboto H., J.of Applied Polymers Science, Vol.73, 7, 1259, 1999.
259. Kato Y., Uchida S., Kawakiski S.J., J.of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 40, 3, 373, 1992.
260. Griffith C.E., Russman A.N., Majmudar G., Singer R.S., Hamilton T.A., Voorhees J.J., Engel N., J. Med., 329, 530, 1993.

261. Halliwele B., in *Oxidative Stress in Dermatology*, Marcel Dekker, Inc., New York, 53, 181, 1999.
262. Kohen R., Biomed. Pharmacother, 53, 181, 1999.
263. Khettab N., Amory M., Briand G., Bousquet B., Combre A., Forlot P., Barey M., Biochimie, 70, 1709, 1988.
264. Krol E.S., Dramer-Stickland K.A., Liebler D.C., Drug Metabolism Review, 32, 413, 2000.
265. Darr D., Dunston S., Faust H., Pinnell S., Acta Derm. Venerol., 76, 264, 1996.
266. Quevedo W.C., Holstein T.J., Dyckman J., McDonald J., Isacson E.L., Pigment Cell Res., 13, 89, 2000.
267. Record I.R., Dreosti I.E., Konstantinopoulos M., Buckley R.A., Mice. Nutr. Cancer, 16, 219, 1991.
268. Stahl W., Heinrich V., Jungmann H., Sies H., Tronnier H., Am. J. Clin. Nutr., 71, 795, 2000.
269. Varani J., Warner R.L., Gharace-Kermani M., J. Invest. Dermatol., 114, 480, 2000.
270. Werninghaus K., Meydani M., Bhawan J., Margolis R., Blumberg J.B., Gilchrist B.A., Arch. Dermatol., 130, 1257, 1994.
271. Thiele J.J., Traber M.G., Tsang K., Cross C.E., Packer L., Free Rad. Biol. Med., 23, 385, 1997.
272. Korac B., Buzadzic B., J. Dermatol. Sci., 25, 45, 2001.
273. Longhin S., Popescu A., *Fotodermatoze*, Ed. Acad. Române, București, 1972.
274. Davidson R.L., Cooper D.R., Biochem. J., 105 (3), 965, 1967.
275. Averl N.C., Bailey A.J., J. Biological Chem., Vol. 275, 3, 33014, 2000.
276. Sionkowska A., *Polymer Degradation and Stability*, Vol. 68, 2, 147, 2000.
277. Rittié L., Fisher G.J., Ageing Res. Review, 1, 705, 2002.
278. Fodor O., *Biologia și vârsta*, Ed. Dacia, Cluj-Napoca, 1971.
279. Milch R.A., J. Southern Med. Assoc., 5, 215, 1965.
280. Fels I.G., Gerontologia, 12, 109, 1966.
281. Scheraga H.A., in *The Proteins*, Vol. I, Acad. Press New York, 1963.
282. Rayssignier Y., Durlach J., Guet-Bara A. & Bara M., in *Metal ions in Biology and Medicine*, eds. Ph. Collery, L.A. Poirier, Manfait M & Etienne J.C., Paris: John Libbery Eurotext, 1990.
283. Durlach J., Durlach V., Rayssignier Y., Bara M. & Guet-Bara A., Age Nutr. 4, 94, 1993.

284. Rayssignier Y., Durlach J., Gueux E., Rock E., Mazur A., Magnier. Res., 6, 373, 1993.
285. Gunther T., Magnes. Bull., 13, 78, 1991.
286. Gunther T., Vormann J., Hollriegel V., Disch G. & Classen H. G., Magnes. Bull., 14, 57, 1992.
287. McCoy H., & Kenney M.A., Magnes. 5, 281, 2009.
288. Ma W., Wlaschek M., Tanchcheva-Poor I., Clin. Exp. Dermatol. 115, 177, 2001.
289. Lavker R.M., in Gilchrist B., ed., Photodamage, Vol. I, Cambridge, England: Blackwell Science Inc., 123, 1995.
290. Fisher G.J., Voorhees J.J., J. Invest. Dermatol., 3, 61, 1998.
291. Yaar M., Gilchrist B.A., Clin. Geriatr. Med., 17, 617, 2001.
292. Fleischmayer R., Olsen B.R., Kühn K., *Structure, Molecular Biology, Pathology of Collagen*, Vol. 580, Acad. Of Sci., New York, 1990.
293. Welsh C., Gay S., Rhodes R.K., Pfister R., Biochim. Biophys. Acta, 78, 625, 1980.
294. Moro L., Smith B.D., Arch. Biochim. Biophys., 33, 182, 1977.
295. Cunningham L.W., Frederiksen D.W., *Methods in Enzymology*, Vol. 82, Acad. Press, New York, 1982.
296. Maine R., Burgeson R.E., *Structure and Function of Collagen Types*, Biology of Extracellular Matrix, Seria A, Dcad. Press, New York, 1978.
297. Glazer A.N., Delange R.J., Sigman B.S., *Chemical Modifications of Proteins*, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, 1988.
298. Beral E., Zapan M., *Chimie organică*, Ed. Tehnică, București, 1983.
299. Speakman J.B., J.S.L.T.C., 2, 37, 1953.
300. Brener M., Huber W., Helv. Chim. Acta, 36, 1092, 1953.
301. Brevet, 3 227 571, USA.
302. Brevet, 3 255 000, USA.
303. Bucevski M.D., Chiriță Gh., Rev. Ind. Ușoară, 9, 387, 1981.
304. Bucevski M.D., Chiriță Gh., Rev. Ind. Ușoară, 4, 206, 1983.
305. Klotz I.M., Heiney R.E., Arch. Biochem. Biophys., 96, 605, 1962.
306. Yahn H., Wegerle D., Das Leder, 5, 121, 1954.
307. Bucevski M.D., Oltean M., Colț M., Rev. Ind. Ușoară, 37, 57, 1990.
308. Bucevski M.D., Chiriță Gh., Rev. Ind. Ușoară, 30, 103, 1983.
309. Reed R., *Science for Students of Leather Technology*, Pergamon Press, Oxford, London, Edinburgh, New York, Toronto, Paris, Frankfurt.
310. Bibliotek des Leders, Band II, Zissel A., *Arbeiten der Wasserwerkstatt bei der Lederherstellung*; Band III, Faber K., *Gerbmittel, Gerbung, Nachgerbung*; Band IV, Martin Hollstein, *Entfetten, Fetten, Hydro-*

- phobieren bei der Lederherstellung*; Umschau Verlag-Frankfurt am Main, 1984-1986.
311. Herfeld H., Zissel A., Schmidt G., Magerkurth B., *Das Leder*, 31, 17, 1980.
312. Chiriță Gh., Alexa G., *Revue Techn. des Ind. du Cuir*, 1957, 6; 1958, 5, 1959, 4; 1961, 1.
313. Chiriță Gh., Alexa G. Chiriță A., *Rev. nd. Ușoară*, 1, 1963.
314. Chiriță Gh., Alexa Gh., Chiriță A., *Rev. Techn. es Ind du cuir*, 278, 1962.
315. Chiriță Gh., Alexa Gh., Chiriță A., *Rev. Techn. des Ind. du cuir*, 3, 1963.
316. Chiriță Gh., Alexa Gh., Chiriță A., *Rev. Techn. des Ind. du Cuir*, 6, 1965.
317. Chiriță Gh., Alexa Gh., Chisăliță D., *Rev. Ind. Ușoară*, 1, 1971.
318. Chiriță Gh., Chisăliță D., J.A.L.C.A., Vol. LXVI, 8, 1971.
319. Chiriță Gh., Chiriță A., Bulacovschi J., Vol. LXIX, 12.
320. Matsuda K., Suzuki S., Isshiki N., Ikada Y., *Biomaterials*, 14, 1030, 1993.
321. Suzuki S., Matsuda K., Isshiki N., Tamada Y., *Biomaterials*, 11, 356, 1990.
322. Matsuda K., Suzuki S., et al., *Biomaterials*, 11, 351, 1990.
323. Matsuda K., Suzuki S., et al., *Biomaterials*, 13, 119, 1992.
324. Stasny K., Hora K., Stol M., *Biomaterials*, 14, 1105, 1993.
325. Cirelli J.A., Marcantonio R.A., et al., *Biomaterials*, 18, 1227, 1997.
326. Wikesjo U.M.E., Nilveus R.E., Selvic K.A., *J. Periodolal*, 63, 158, 1992.
327. Caffese R.G., Dominguez L.E., et al., *J. Periodonal*, 61, 45, 1990.
328. Plepis A.M., Giosis G., *Polym. Engl. Sci.* 36, 2932, 1996.
329. Yannes I.V., *Encyclopedia of Polzmer Science and Engineering*, Vol. 15, Wiley, New York, 1989.
330. Fujisato T., Sajiki T., Liu Q., Ikada Y., *Biomaterials*, 17, 155, 1996.
331. Berthod F., Hayek D., Damour O., Collombel C., *Biomaterials*, 17, 749, 1993.
332. Schuman L., Buma P., et al., *Biomaterials*, 16, 809, 1995.
333. Colț M., Bucevski M.D., Alupeu C., Boureanu M., *Sesiune Științifică, Facultatea de Chimie Industrială și Ingineria Mediului, Timișoara*, 1998.
334. Jeyanthi R., Rao K.P., *J. of Appl. Polymer Sci.*, 43, 2333, 1991.
335. Soldani G., Mercogliano R., *The Int. J. of Art. Organs*, 14, 295, 1991.
336. Bucevski M.D., Colț M., Chiriac L., *Science, Technologies and Applications*, ECCM-8, Vol. I, ed. Crivelli Visconti I., Woodhead Publ. Ltd., Cambridge, England, 1998.
337. Chatterji P.R., *J. Appl. Polym. Sci.*, 40, 1990.
338. Sabolinski M.L., Alvarez O., et al., *Biomaterials*, 17, 311, 1996.
339. Cohen I.K., *Wound Helting*, Philadelphia, Saunders, 1992.

340. Sittinger M., Bujia J., Rotter N., et al., *Biomaterials*, 17, 237, 1996.
341. Jain M.K., Berg R.A., Tandon G.P., *Biomaterials*, 11, 405, 1990.
342. Bonzon N., Carrat X., Deminiere C., et al., *Biomaterials*, 16, 881, 1995.
343. Mikos A.G., Sarakinos et al., *Biomaterials*, 14, 323, 1993.
344. Bader J.M., *Science & Vie*, 70, 925, 1994.
345. Matsui R., Okura N., Osaki K., et al., *Biomaterials*, 17, 995, 1996.
346. Chen C.S., Yannas I.V., Spector M., *Biomaterials*, 16, 777, 1995.
347. Matsui R., Osaki K., Konishi J., et al., *Biomaterials*, 17, 989, 1996.
348. Takakuda K., Miyairi H., *Biomaterials*, 17, 1393, 1996.
349. Shalaby S.W., *Biomedical Polymers: Designed to Degrade System*, Hansen, New York, 1994.
350. Norton L., Chvapil M., *J. Trauma*, 21, 463, 1981.
351. Tranquillo R.T., Gorton T.S., et al., *biomaterials*, 17, 349, 1996.
352. Hinrichs W.L.J., Zweep H.P., Satoh S., Feijen J., *Wildevuur Ch. R. H., Biomaterials*, 15, 83, 1994.
353. Esposito E., Cortesi R., Nastruzzi C., *Biomaterials*, 17, 2009, 1996.
354. Majors K.R., Friedman M.B., *Polymer for Controlled Drug Delivery*, CRC. Press, Boca Raton Florida, USA, 1991.
355. Chiriță M., *Sisteme de eliberare a substanțelor bioactive*, Vol.I, Editura Tehnopress, Iași, 2004.
356. Chien Y.W., *Handbook of Experimental Pharmacology*, Juliano R.L. ed., Vol. 100, Springer, Berlin, 1991.
357. Dressman J.B., Ridout G., Guy R.H., *Comprehensive Medicinal Chemistry*, Taylor H.S. ed., Pergamon Press, Oxford, 1990.
358. Miller A.T., *J.A.L.C.A.*, 91, 183, 1996.
359. Meullenet J.F., et al., *Resurreccion A.V., J. of Food Sci.*, 59, 729, 1994.
360. Vieth W.R., Gilbert S.G., Wang S.S., *Trans. N.Y., Academy of Science*, 34, 54, 1972.
361. Cabeza L.F., Taylor M.M., Brown E.M., Marmer W.N., *J.A.L.C.A.*, 94, p.182, 1999.
362. Mareș E., *Rev. Ind. Ușoară*, 2, 55, 1984.
363. Dumitriu S., Popa M., *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 4, 151, 1989.
364. Levy J., Bagg C., *J.A.L.C.A.*, 90, 118, 1995.
365. Chiriță Gh., Bucevschi M.D., Chirica M., Herlea M., Mihalea M., *Rev. Ind. Ușoară*, 3, 103, 1988.
366. Bucevschi M.D., Chiriță Gh., Oltean M., Ciurdea R., Popa Gh., *Brevet*, nr. 90713, 1986.
367. Cioca G., Trandafir V., *Rev. Ind. Ușoară*, 24, 249, 1977.

368. Trandafir V., *Rev. Ind. Ușoară*, 34, 247, 1987.
369. Kneip M., *Das Leder*, 46, 106, 1995.
370. Vinklerek Z., Vodruska M. *J.S.L.T.C.*, 74, 16, 1990.
371. Lee J.S., *J.S.L.T.C.*, 56, 215, 1972.
372. Schlosser L., *Das Leder*, 8, 149, 1990.
373. Thomson R.S., *Das Leder*, 36, 190, 1985.
374. Bucevschi M.D., Chiriță G., Varo E., Syekely M., *Brevet nr. 84046*, 1984.
375. Calciati G., Lacati L., *Technologie conciarie*, 7, 231, 1991.
376. Reich G., *Leder und Hautemarkt*, 35, 1, 1983.
377. Otani Y., Tabata Y., Ikada Y., *Biomaterials*, 17, 1387, 1997.
378. Chiriță Gh., Chiriță M., Pop O., Flocea A., *Rev. Ind. Ușoară*, 36, 13, 1989.
379. Adzet J.M., *AQEIC Bol. Tec.*, 44, 227, 1993.
380. Jackson D.S., Williams G., *Nature*, 178 (4539), 915, 1956.
381. Puchtler H., Waldrop F.W., *Histochemistry*, 57 (3), 177, 1978.
382. Siegfried M.(1892), (citat în Glegg end all „*Some carbohydrate components of Reticular Fibers*”, *Science*, New series, vol. 118, no. 3073, nov. 20, 614-616, 1983.
383. Li S.T., *Bilogic biomaterials: Tissue-derived biomaterials*, in: Bronzino J.D., ed., *The Biomedical Engineering Handbook*, 2 edn. Boca Raton, FL, CRC Press, 2000.
384. Hulmes D.J., *Building collagen molecules, fibrils and suprafibrillar structures*, *J. Struct. Biol.*, 137, 2-10, 2002.
385. Ottani V., Raspanti M., Ruggeri A., *Collagen structure and functional implication*, *Micron*. 32, 251-260, 2001.
386. Rosso F., Marino G., et al., *Smart materials as scaffolds for tissue engineering*, *J. Cell. Physiol.*, 203, 3, 465-470, 2005.
387. Lee C.H., Singla A., Lee Y., *Biomedical applications of collagen*, *Int.J.Pharm*, 221, 1-2, 1-22, 2001.
388. Schoof H., Apel J., Heschel I., Rau G., *Control of pore structure and size in freeze-dried collagen sponge*, *J. Biomed. Mater. Res.*, 58 (4), 352-357, 2001.
389. Faraj K.A., Van Kuppervelt T.H., Daamen W.F., *Construction of collagen scaffolds that mimic the tree-dimensional architecture of specific tissue*, *Tissue Engineering*, 13, 10, 2367-2394, 2007.
390. Sallach R., Chaikof E., Emory University, Georgia Institute of Technology, USA, in: *Natural-based polymers for biomedical applications*, CRC Press Woodhead Publishing Limited, Cambridge England, 2008.
391. Li D.A., Xia Y., *Electrospinning: Reinventing the wheel* *Advanced Materials*, 16, 1151-1170, 2004.

392. Kadler K., Holmes D.F., Trotter J.A., Champman J.A., *Collagen fibril formation*, Biochem J., 316, 1-11, 1996.
393. Beck K., Brodsky B., *Supercoiled protein motifs: the collagen triple-helix and the α -helical coiled coil*, J. of Structural Biology, 122, 17-29, 1998.
394. Brodsky B., Ramshaw J., *The collagen triple-helix structure*, Matrix Biology, 15, 545-554, 1997.
395. Silver F.H., Garg A., *Handbook of biodegradable Polymers* (eds), Domb A.J., Kost J., Wiseman D.M., Hardwood Academic Publishers.
396. Fagien S., *Human-derived and new synthetic injectable materials for soft-tissue augmentation: current status and role in cosmetic surgery*, Plast. Reconstr. Surg., 105, 2526-2528, 2000.
397. Purna S.K., Babu M., *Collagen based dressings—a review*, Burns, 26, 54-62, 2000.
398. Hirano S., Zhang M., et al., *Wet spun chitosan-collagen fibers. Their chemical N-modifications and blood compatibility*, Biomaterials, 21, 997-1003, 2000.
399. Fofonoff T.W., Bell E., *Method for spinning and processing collagen fiber*, USA Patent 5911942, 1999.
400. Stitzel J., Liu J., Lee S.J., Komura M., Berry J., Soker S., Lim G., Van Dike M., Czerw R., Yoo J.J., Atala A., *Controlled Fabrication of a biological vascular substitute*, Biomaterials, 27, 1088-1094, 2006.
401. Li M., Mondrinos M.J., Gandhi M.R., Ko F.K., Weis A.S., Lelkes P.I., *Electrospun protein fibers as matrices for tissue engineering*, Biomaterials, 26, 5999-6008, 2005.
402. Buttafoco L., Kolkman N.G., et al., *Electrospinning collagen and elastin for tissue engineering small diameter blood vessels*, J. Control Release, 101, 322-324, 2006.
403. Zhong S., Teo W.E., Zhu X., Benerman R., Ramakrishna R., Yung L.Y., *Formation of collagen-glycosaminoglycan blended nanofibrous scaffold and their biological properties*, Biomacromolecules, 6, 2998-3004, 2005.
404. Zhong S., Teo W.E., et al., *An aligned nanofibrous collagen scaffold by electrospinning and its effects on in vivo fibroblast culture*, J. Biomed. Mater. Res. A, 79, 456-463, 2006.
405. Mathews J.A., Winek G.E., Simpson D.G., Bowlin G.L., *Electrospinning of collagen nanofibres*, Biomacromolecules, 232-238, 2002.
406. Chiriță M., Ionescu C.M., *Models for mechanical properties in biomimetic materials for vascular grafts* in On Biomimetics, 43-52, Ed. Lilyana D. Pramatarova, INTECH, 2011.

407. Mandru M., Ionescu C.M., Chiriță M., *Modelling mechanical properties in native and biomimetically formed vascular grafts*, Journal of Bionics Engineering., 6, 4, 371-377, 2009.
408. Ionescu C.M., Chiriță M., *Stress-strain properties of natural and biometrically formed collagen constructs*, International Journal of Health Care Engineering, Technology and Health Care, IOS Press, 16, 6, 437-444, 2008.
409. Chiriță M., *Mechanical properties of collagen biomimetic films formed in the presence of calcium, silica and chitosan*, Journal of Bionics Engineering, 5, 2, 149-159, 2008.
410. Singh P. et al., *Isolation and Characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (Pangasiannodon hypophthalmus)*, Food Chem., 124, 1, 2011.
411. Nalinanon S., et al., *Type I collagen from the skin of ornate threadfin bream (Nemipterus hexodon): Characteristics and effect of pepsin hydrolysis*, Food Chem., 125, 2, 500-507, 2011.
412. Huang Y.R., et al., *Isolation and characterisation of acid and pepsin-solubilized collagens from the skin of balloon fish (Diodon holocanthus)*, Food Hydrocoll., 25, 6, 1507-1513, 2011.
413. Kittiphattanabawon P. et al., *Isolation and properties of acid and pepsin-soluble collagen from the skin of blacktip shark (Carcharhinus limbatus)*, Eur. Food Res. Technol., 230, 3, 475, 2010.
414. Chen I. et al., *Extraction and characterisation of acid-soluble collagen from scales and pig skin of tilapia (Oreochromis niloticus)*, LWT Food Sci. Technol., 66, 2016.
415. Ahmad M., Benjakul S., *Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from the skin of unicorn leatherjacket (Aluterus monoceros)*, Food Chem., 120, 3, 817-824, 2010.
416. Hsieh C.H., et al., *Isolation and characterisation of collagens from the skin of giant grouper (Epinephelus lanceolatus)*, J. Aquat. Food Prod. Technol., 25, 1, 93-104, 2016.
417. Liu D., et al., *Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from fins: scales, skins, bones and swim bladders of bighead carp (Hyphalichthys nobilis)*, Food Chem., 133, 4, 1441-1448, 2014.
418. Minh T.T., et al., *Isolation and characterisation of acid-soluble collagen from the scales of marine fishes from Japan and Vietnam*, Food Chem., 149, 3, 264, 2014.

419. Zang M., Liu W., Li G., *Isolation and characterisation of collagens from the skin of largefin longbarbel catfish (Mystus macropterus)*, Food Chem., 115, 3, 826-831, 2009.
420. Zeng S.K., et al., *Extraction and characterisation of acid-solubilised collagen from the skin of Nile tilapia (Oreochromis niloticus)*, Food Chem., 116, 4, 879-883, 2009.
421. Benjakal S., et al., *Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from the skin of bigeye snapper*, J. Sci. Food Agric., 90, 1, 132-138, 2010.
422. Jing Wang, Xinli Pei, et al., *Extraction and characterization of acid-soluble and pepsin-soluble collagen from skin of loach*, Int. J. of Biological Macromolecules, 106, 544-550, 2018.
423. Scott A. Sell, McClure M.J., et al., *Electrospinning of collagen/biopolymers for regenerative medicine and cardio-vascular tissue engineering*, Adv. Drug Rev., 61, 1007-1019, 2009.
424. Stanger J., Tucker N., Staiger M., *Electrospinning*, Rapra Rev. Reports, 16, 10, 2005.
425. Seeram Ramakrishna, Kazutoshi Fujihara, Wee-Eong Teo, Teik-Cheng Lim, Zuwei Ma, *Electrospinning and Nanofibers*, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. 2005.
426. Anthony L. Andrady, *Science and Technology of Polymer Nanofibres*, Wiley & Sons, New Jersey, 2008.
427. P. J. Brown and K. Stevens Ed., *Nanofibers and nanotechnology in textiles*, CRC Press, Boca Raton, N.Y., 2007.
428. Ji-Huan He, Yong Liu, Lu-Feng Mo, Yu-Qin Wan and Lan Xu, *Electrospun Nanofibers and Their Applications*, iSmithers, UK, 2008.
429. Mengyan Li, Mondrinos M.J., Gandhi M.R. & all, *Electrospun protein fibres for tissue engineering*, Biomaterials 26, 5999-6008, 2005.
430. Dawei Z., Xiaowei W., Jingdi C., Kali L., *The development of collagen based composites scaffolds for bone regeneration*, Bioactive Materials XXX, 1-10, 2017.
431. Bruck J., Aras O. et al, *Observation of triple-helix motif on electrospun collagen nanofibers and its effect on the physical and structural properties*, Journal of Molecular Structure, 1151, 78-80, 2018.
432. Crinzia F., Leggio L., et al, *Marine-derived collagen biomaterials from echinoderm connective tissues*, Marine Environmental Research, 128, 46-57, 2017.
433. Rihard-Blum S., Baffet G., Theret N., *Molecular and tissue alterations of collagens in fibrosis*, Matrix biology, online 17.02.2018.

434. Zhang D., Wu X., Chen J., Lin K., *The development of collagen based composite scaffolds for bone regeneration*, Bioactive Materials, 3, 1, 129-138, 2018.
435. Andriakopoulou C.E., Zadpoor A.A., et al., *Development and mechanical characterisation of self-compressed collagen gels*, Mat. Sci. And Engineering, C, 84, 243-247, 2018.
436. Abdollahi M., Rezaei M., et al., *Sequential extraction of gel-forming proteins, collagen and collagen hydrolysate from gutted silver carp (Hypophthalmichthys molitrix), a biorefinery approach*, Food Chemistry, 242, 568-578, 2018.
437. Brooks A.L., Harmon K.A., et al., *Constitutive modeling of compressible type-I collagen hydrogels*, Medical Engineering & Physics, 53, 39-48, 2018.
438. Ponusa Jitphuthi et al., *Hierarchical porous formation, collagen and mineralized collagen modification of polylactic acid to design mimicked scaffolds for maxillofacial bone surgery*, Materialstoday, 13, 46-52, 2017.
439. Gauza-Włodarczyk M., Kubisz L., et al., *Comparison of thermal properties of fish collagen and bovine collagen in the temperature range 298-670 K*, Mater. Science and Engineering, C, 80, 468-471, 2017.

CAPITOLUL 13**ELASTINA**

13.1.	Introducere	1124
13.2.	Caracteristici histologice ale țesutului elastic	1125
13.3.	Chimia și biochimia elastinei	1127
13.4.	Biofizica elastinei	1135
13.5.	Proprietățile fizice și chimice ale elastinei	1136
13.6.	Elastazele și acțiunea lor asupra elastinei	1138
13.7.	Reticulările dintre elastină și collagen	1139
13.8.	Implicațiile elastinei în procesul de îmbătrânire	1144
13.9.	Elastina ca biomaterial	1146
13.9.1.	Biomateriale derivate de la elastine naturale	1148
13.9.1.1.	Țesuturi decelularizate care conțin elastină	1148
13.9.1.2.	Purificarea elastinei	1150
13.9.1.3.	Elastina hidrolizată	1154
13.9.2.	Biomateriale derivate de la elastine bio (sintetice)	1155
13.9.2.1.	Tropoelastina bio (sintetică)	1155
13.9.2.2.	Fragmente de tropoelastină	1156
13.9.2.3.	Polimeri asemenea elastinei	1156
13.9.2.4.	Hibridi ai elastinei cu alte molecule	1157
13.10.	Aplicațiile elastinei la biomateriale	1159
13.10.1.	Înlocuitori de piele	1159
13.10.2.	Construcții vasculare	1159
13.10.3.	Autoasamblarea materialelor	1160
13.11.	Rezilina și abductina	1161

Bibliografie**1163**

13.1. INTRODUCERE

Elastina este un component important în rândul proteinelor fibroase și este una dintre cele mai stabile și insolubile proteine. În ultimele decenii, s-au făcut progrese însemnate care au scos în evidență posibilitățile de utilizare a elastinei, ca biomaterial, datorită unor proprietăți ca: elasticitatea, stabilitatea îndelungată, activitatea biologică, autoasamblarea. Elastina poate fi folosită ca biomaterial sub formă de fragmente de tropoelastină, elastină insolubilă din fibre, elastină solubilă din hidrolizate etc. [1, 2].

Tropoelastina, proteina precursoră elastinei și elastina asemănătoare oligopeptidelor, au potențialul de autoasambare în condiții fiziologice. Aceasta constituie baza procesului de coacervare, care, probabil, conduce la alinierea prealabilă a moleculelor de tropoelastină, în vederea formării legăturilor transversale intermoleculare [3, 4]. Elastina insolubilă, care rezultă, are timpul de înjumătățire de circa 70 ani, fiind una din cele mai stabile proteine cunoscute [5, 6].

Elastina se găsește în variate țesuturi conjunctive ale corpului uman și ale animalelor și este abundentă în organele în care elasticitatea are o mare importanță. Astfel, se găsește în cantitate mare în vasele de sânge, așa cum este aorta, care se întinde și se relaxează de un bilion de ori în timpul unei vieți, în ligamentele elastice și, în special, în ligamentum nuchae, în cartilaj, plămâni, vezica urinară și în piele [7, 8].

Elastina reprezintă circa 70%, raportat în greutate uscată, din ligamentele elastice, aproximativ 50% în arterele mari, 30% în plămâni și 2-4 % în piele [9, 18, 11].

Elastina insolubilă se prezintă sub formă de rețele de fibre și sub formă de fășii. În stratul reticular al dermului pielii, se prezintă sub formă de fășii, iar în stratul papilar al dermului, sub formă unei rețele tridimensionale de fibre și fibrili, prinzând, ca într-o plasă, fasciculele de collagen [12, 13].

În plămân, elastina se prezintă ca o rețea de fibre fine [14]. În ligamente, în *media* elastică a arterelor, elastina se găsește sub formă de fibre, mai mult

sau mai puțin, orientate paralel cu axa vasului. În cartilajul elastic prezent în auricul și epiglottis, fibrele elastice sunt dispuse într-o structură de fagure [7].

13.2. CARACTERISTICI HISTOLOGICE ALE ȚESUTULUI ELASTIC

În afară de diferențele fundamentale de structură, pe baza cărora se poate face deosebirea dintre collagen și elastină, aceste două componente ale țesutului conjunctiv diferă foarte mult între ele prin proprietățile lor de colorare.

Fibrele elastice apar ca elemente galbene, cu aspect ondulat, întrețesute cu fibrele de collagen.

Elastina se colorează cu orceina și rezorcinol-fuxina.

S-ar părea că modalitatea de fixare a acestor două tipuri de coloranți, ambii bazați pe prezența unei grupe fenolice, este dependentă de disponibilitatea elastinei pentru fixarea hidrogenului de-a lungul scheletului moleculei. Totuși, caracterul selectiv al acestor coloranți pentru elastină, spre deosebire de collagen, se pare că ar fi asociat cu numărul diferit de grupe bazice și acide din lanțurile laterale prezente în cele două proteine.

Elastina este relativ lipsită de aminoacizi diaminici și dicarboxilici și, deci, este foarte puțin capabilă de a se combina cu coloranții acizi sau bazici. În același timp, nu există nici o respingere vizibilă a coloranților fenolici. Pe de altă parte, prezența unor astfel de grupe în molecula de collagen elimină adsorbția de coloranți, cum sunt orceina și rezorcinol-fuxina.

Pentru a se demonstra aceasta, s-au blocat grupele carboxilice libere din collagen prin esterificare și s-a constatat că, în acest caz, coloranții specifici ai elastinei sunt fixați, la fel de bine, și de collagen. De asemenea, elastina degradată parțial cu elastază, deși își păstrează structura, este complet lipsită de capacitatea de a se colora cu coloranții menționați. În timpul primelor faze de elastoliză, se eliberează noi grupe α -aminice și α -carboxilice, ceea ce permite să se creeze o încărcare electrică asemănătoare, în multe privințe, cu cea întâlnită la collagen [15].

Pentru identificarea elastinei, se pot folosi și alți coloranți, dar aceștia sunt mai puțin specifici decât cei bazați pe fenoli. De exemplu, colorantul albastru de anilină al lui Mallory colorează collagenul în albastru și elastina în roșu. De

asemenea, o diferențiere similară are loc și în cazul colorantului tricrom al lui Masson. Unele rezultate se pot obține și cu hematoxilina, fucsina bazică, acidul osmic, negrul de Sudan, la care, în multe situații, vopsirea se limitează numai la zona periferică a fibrei de elastină.

În lucrările de început referitoare la țesutul elastic, acesta era denumit țesutul conjunctiv de fibre galbene și era recunoscut după aparența sa.

Când sunt examinate în lumină polarizată, fibrele elastice demonstrează numai un grad slab de birefrință în stare destinsă, care se observă ușor, în raport cu fibrele de collagen ce sunt foarte anizotropice.

Fibrele elastice sunt compuse din elastină amorfă și microfibrili care au un diametru de 10–12 nm [16, 17].

Asamblarea fibrei este un proces în care sunt implicate mai multe molecule diferite.

Tropoelastina, precursorul elastinei, este sintetizată în reticulul endoplasmic rugos celular. Se eliberează peptida semnal, are loc procesul de hidroxilare a unor proline de către prolil-hidroxilaza și, apoi, imediat este legată ca elastină-proteină (67 kDa) [18].

Această proteină însoțitoare este, de asemenea, o subunitate a elastinei-laminin receptor și este prezentă în multe tipuri de celule ca: fibroblastele, celulele mușchiului neted vascular, celulele endoteliale, condrocitele, limfocitele, mastocitele și leucocitele polimorfonucleare [19]. Receptorul este compus din două subunități transmembranare de 55 și 61 kDa și 67 kDa elastină-proteină legată și are o poziție de legare pentru elastină sau laminină și pentru galactozidă (de exemplu, lactoză sau un glicozaminoglican, cum sunt condroitin sulfatul sau dermatan sulfatul) [20, 21]. Elastina-proteină legată eliberează tropoelastina prin legarea galactozidei de componentul microfibrilar în spațiul extracelular.

În afara celulei, componenții microfibrilari acționează ca un schelet, în care elastina se depozitează.

Microfibrilii se așează în jurul structurii fibrei de elastină. Moleculele de tropoelastină se leagă transversal unele de altele, rezultând formarea legăturii-

lor transversale interlanț, la care participă amino-acizii desmozina și izodesmozina [11, 22, 23].

Legarea transversală duce la elastina matură, care este insolubilă și foarte stabilă.

Pe lângă elastină, fibrele elastice conțin sau sunt asociate cu molecule diferite ca: fibrilina, microfibril-glico(proteine) asociate, fibruline, emiline, proteoglicani și lizil-oxidaze [24].

Sulfatul de heparină, un glicozaminoglican, are un rol important în formarea fibrei elastice; el reacționează cu tropoelastina și s-a identificat în fibrele elastice ale dermului uman [24, 25].

S-a sugerat că fibrilii fini, care reprezintă primul stadiu al formării fibrelor elastice, se contopesc, iar fibrele elastice constau dintr-un „miez” amorf înconjurat de un șir de fibrili, care n-au ajuns să fie absorbiți de structura principală. Astfel, suprafața exterioară a fibrei elastice are un aspect rugos, datorită acestor elemente semiabsorbite de pe suprafața ei. Studiile cu privire la acțiunea elastazei asupra fibrelor elastice au arătat că fibrele relativ cilindrice colapsează în timpul elastolizei. În această stare au devenit vizibile, la microscopul electronic, semnele unei structuri interioare. Pe baza acestor observații s-a tras concluzia că fibra de elastină este formată dintr-un mănunchi de fibrili înconjurați de un material amorf, formând o matrice.

13.3. CHIMIA ȘI BIOCHIMIA ELASTINEI

Elastina este codată printr-o singură genă. La alegerea înbinării cap la cap a transcripțiilor, conduce la tropoelastine în variate izoforme. Exonii genei elastinei (până la 36) sunt amestecați printre izotroni [26, 27]. Multe asemănări sunt între tropoelastinele diferitelor specii și, mai ales, în domeniul legăturilor transversale și domeniile 33 și 36 (codarea este de la C-terminal) [28, 29].

Elastina umană este sintetizată la ~72 kDa precursor solubil (tropoelastina) în diferite celule: celulele mușchiului neted, celulele endoteliale, fibroblastele, condrocitele [30, 31].

Molecula de tropoelastină constă din două tipuri de domenii codate prin exoni separați: domeniile hidrofobe cu multe resturi de Gly, Val, Ala, Pro, care adesea se repetă împreună cu mai mulți aminoacizi, astfel: Gly-Val-Gly-Val-Pro, Gly-Val-Pro-Gly-Val și Gl-Val-Gly-Val-Ala-Pro și domenii hidrofile cu mai multe resturi de Lys și Ala. Resturile de lizină sunt adesea interpușe între resturile de Ala, de exemplu: Ala-Ala-Ala-Lys-Ala-Ala-Lys-Ala-Ala și aceasta este important în formarea legăturilor transversale tetrafuncționale din domeniile hidrofobe ale moleculei de elastină, când se juxtapun resturile de lizină implicate în formarea legăturilor transversale.

Trei domenii hidrofobe care flanchează două domenii reticulate sunt suficiente pentru a suporta procesul de autoasamblare [32]. Patru resturi de lizină, de la moleculele de tropoelastină, reacționează unele cu altele pentru a forma desmozina sau izodesmozina [33-37].

La formarea legăturilor transversale covalente, participă o moleculă de lizină, ca atare, ce se condensează cu gruparea carbonil dintr-un rest de lizină dezaminată oxidativ la stadiul de lizil-aldehidă. Acest proces este asemănător cu cel care are loc la stabilirea legăturilor intermoleculare la collagen (vezi cap. 12, Colagenul, subcap.12.2.2.) (Fig. 13.1.).

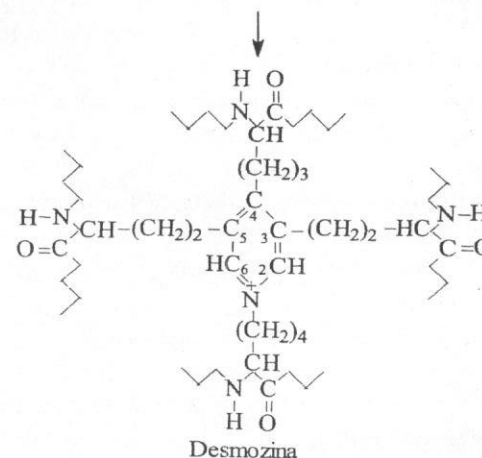
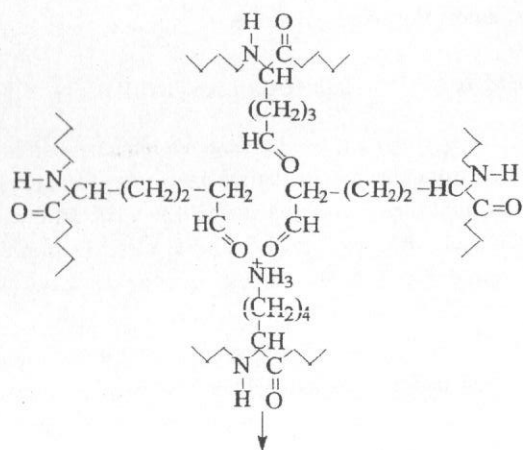


Fig.13.1. Formarea legăturii transversale covalente între lanțurile polipeptidice ale tropoelastinei, care este restul de acid aminic desmozina.

La elastină, se stabilesc legături transversale covalente prin participarea la condensării a trei radicali de lizil-aldehidă, aparținând fiecare catenelor polipeptidice și un radical lizil, ca atare, aparținând unei catene polipeptidice. Compusul rezultat din această condensare este un rest de aminoacid specific elastinei numit *desmozină* sau de *izodesmozină*, care cuprinde ligandul din poziția 4 în poziția 2 (Fig. 13.1.).

Datorită structurii acestor doi compuși se stabilesc punți între catenele polipeptidice ale elastinei, asigurându-se elasticitatea structurii elastice [38].

Elastina are o compoziție în aminoacizi foarte bogată în aminoacizi apolari, care împreună cu legăturile transversale interlanțuri o face insolubilă [9] (tabelul 13.1.).

Aminoacizii prezenți în cantități mai mari în elastină sunt: glicina, alanina, prolina, valina și leucina. De asemenea, este prezentă o cantitate mai mare de tirozină în elastină în comparație cu collagenul. Se remarcă prezența aminoacizilor apolari în proporție de 80-85% din total. În general, toți aminoacizii

polari se găsesc în cantități mici; reprezentând 15–20% din totalul aminoacizilor. Hidroxiprolina se găsește în cantitate foarte mică în comparație cu collagenul. Din cauza conținutului mare în aminoacizi apolari ea este mult mai rezistentă la acțiunea acizilor și alcaliilor, este mult mai puțin reactivă în comparație cu collagenul, nu se transformă în gelatină la fierbere cu apă, este însă digerată de tripsină.

Tabelul 13.1.

Compoziția în aminoacizi a elastinei și collagenului din pielea de bovine

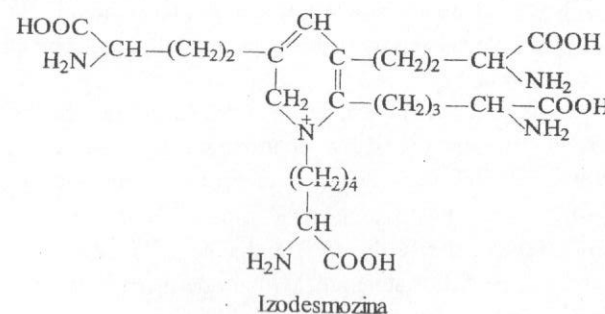
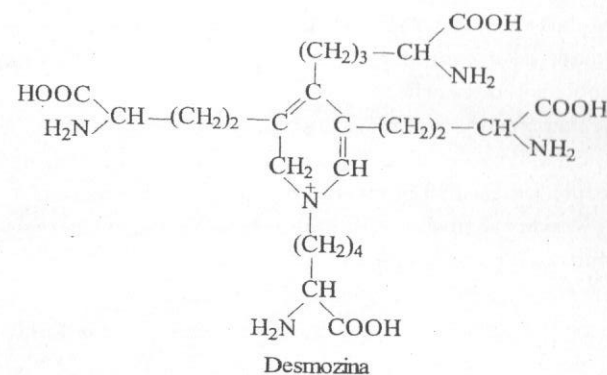
Aminoacidul	g aminoacid / 100 g proteină	
	elastină	colagen
Glicină	3,40	33,30
Alanină	23,0	11,00
Valină	13,0	2,40
Leucină	7,60	1,70
Izoleucină	2,80	1,00
Prolină	18,0	12,80
Fenilalanină	3,70	1,20
Acid aspartic	0,40	4,50
Acid glutamic	2,40	7,30
Serină	0,60	3,60
Treonină	0,60	1,70
Tirozină	3,40	0,28
Histidină	urme	0,48
Arginină	0,70	5,10
Metionină	—	0,60
Lizină	0,60	2,70
Hidroxiprolină	0,90	9,40
Hidroxilizină	—	0,57
1/4 Desmozină	0,70	—
1/4 Izodesmozină	0,90	—

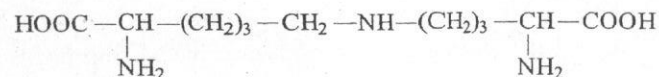
Collagenul conține 55–65% aminoacizi polari și 35–45% aminoacizi apolari, din care cauză se deosebește mult de elastină.

În compoziția elastinei, există următorii aminoacizi care nu se găsesc în collagen și nici în alte proteine: desmozina, izodesmozina, merodesmozina și lizin-norleucina.

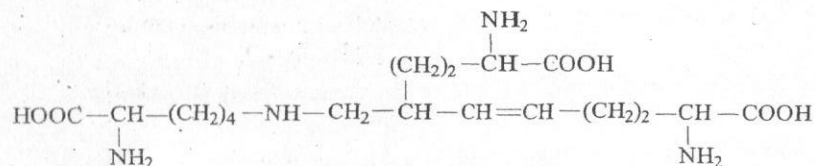
Aminoacizii desmozina și izodesmozina, fiind constant evidențiați în preparatele de elastină, se consideră că prezența lor marchează prezența elastinei, după cum prezența hidroxiprolinei servește drept criteriu pentru identificarea collagenului. De aceea, sunt metode de analiză cantitativă a elastinei pe baza dozării acestor doi aminoacizi.

Desmozina și izodesmozina sunt izomeri structurali și conțin un inel piridinic tetra-substituit în pozițiile: 1, 3, 4, 5 și 1, 2, 3, 5.





Lizin-norleucina



Merodesmozina

Fiecare catenă laterală are o grupă carboxilică și una aminică terminale, care participă la formarea de legături peptidice. Acești aminoacizi derivă din condensarea a patru molecule de lizină.

Desmozina, izodesmozina, merodesmozina și lizin-norleucina participă la constituirea legăturilor transversale, între lanțurile polipeptidice ale elastinei, ceea ce conferă moleculei de elastină proprietățile fizice caracteristice elastomerilor. Desmozina și izodesmozina au capacitatea de a face reticulări transversale prin intermediul celor patru catene laterale de care dispun.

Formarea dezmozinelor are loc parcurgând următoarele faze:

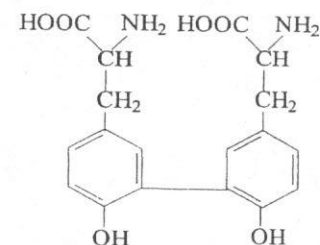
- dezaminarea grupei ε-aminice a resturilor de lizină care duce la formarea aldehydei adipice;
- trei resturi de aldehyde, de pe aceeași catenă sau de pe catene diferite, împreună cu o a patra lizină intactă, se condensează pentru a forma scheletul de carbon și azot al desmozinelor.

Conținutul în desmozină și izodesmozină în elastină este de aproximativ trei resturi pentru 1000 de aminoacizi și fiecare desmozină poate lega până la patru lanțuri polipeptidice. Rezultă, deci, că există un punct de interconectare prin legături transversale la fiecare 80 de resturi de aminoacizi.

Aminoacidul lizin-norleucina derivă din două molecule de lizină și poate interconecta două lanțuri polipeptidice alăturate, iar merodesmozina este formată din trei molecule de lizină și poate interconecta trei lanțuri polipeptidice.

În cazul lizin-norleucinei, după prima fază de dezaminare, semialdehida adipică reacționează cu grupa ε-aminică a lizinei aceleiași catene sau a unei catene alăturate, formând o bază intermediară, care, în final, este redusă la lizin-norleucină.

De asemenea, există posibilitatea formării unor legături transversale în elastină datorită ditirozinei, care a mai fost identificată în rezilină, proteină izolată din cuticula insectelor. Ditirozina se poate forma printr-o legătură bifenilică între două resturi de tirozină.



Ditirozina

Andersen a evaluat conținutul de tirozină în rezilină și a evidențiat prezența și a unor cantități mici de tritirozină și tetratirozină. La Bella și colaboratorii au remarcat prezența ditirozinei în hidrolizatele acide ale mai multor colagene [12].

Prezența glucidelor în constituția elastinei a fost dovedită de apariția substanțelor reducătoare în hidrolizatele de țesut elastic.

Această observație a stat la baza ipotezei structurii glicoproteidice a elastinei. Conținutul în glucide a elastinei variază în limite largi și este în funcție de proveniența sa. S-a constatat că există o corelație între bogăția în glucide a elastinei și intensitatea colorației cu rezorcin-fuxină a fibrelor elastice.

Elastina este și o lipoproteidă.

Componenta lipidică ar constitui aproximativ 0,5% din greutatea uscată a elastinei. Ea conține acizi grași nesaturați și are o structură asemănătoare sfin-gomielinelor, o clasă de fosfatide izolate din țesutul nervos. Din punct de

vedere funcțional, lipidele din elastină, alături de glucide și proteine, ar avea rolul de ciment stabilizator interfibrilar.

Comparativ cu polimerii sintetici de tipul cauciucului, cu care elastina are în comun proprietatea de elasticitate, s-a considerat alcătuirea biopolimerului din lanțuri macromoleculare plisate și orientate la întâmplare, reticulate prin numeroase legături transversale [12].

Modul de structurare a componentei proteice a unui țesut elastic apare mai clar după o elastoliză parțială și apoi un tratament cu ultrasunete. Acest tratament, care duce la diminuarea materialului interfibrilar, permite să se pună în evidență formațiuni fibrilare fine cu diametrul de aproximativ 80 Å, iar la o acțiune mai intensă, apar filamente fine cu diametrul de circa 15 Å.

Filamentele fine (tropoelastina) reprezintă prima treapă din structura fibrelor elastice [39]. Componenta amorfă a matricei ar fi reprezentată de cimentul ce se depune între rețelele fibrilare, menținându-le în relații spațiale și funcționale adecvate. Această matrice interfibrilară apare bogată în glucidele și proteinele care conțin mulți aminoacizi hidrofilii, prin intermediul cărora se asigură gradul de hidratare necesar extensiei și revenirii la normal a catenelor polipeptidice prezente în unitățile constitutive elementare ale fibrelor de elastină.

Partridge și colab. au sugerat un model de elastină care presupune prezența unei structuri globulare legată de desmozină prin reticuri. În timpul biosintezei, extracelular, reticulările de tip desmozină, *in vivo*, se realizează prin unirea a patru lizine din lanțurile care trebuie să se apropie unele de altele, într-o astfel de orientare, încât să se producă o reticulare de tip desmozină [40-43] (Fig. 13.1.).

Umflarea și comportarea la tensiune-deformare a elastinei arată că lanțurile polipeptidice se prezintă în formă asociată, indicând o comportare elastică asemănătoare cauciucului. Aceasta cere catenelor polipeptidice să aibă o configurație dezordonată ca într-un elastomer.

K.A. Piez a arătat că este posibil ca, inițial, fibrele de elastină să fie compuse din unități identice, dispuse într-o ordine regulată, dar, cu timpul sau după reticulare, poate să aibă loc un proces similar denaturării, care să trans-

forme structura într-o rețea de catene cu o așezare dezordonată ca într-un elastomer [44].

13.4. BIOFIZICA ELASTINEI

Elasticitatea, tranziția vitrosă și coacervarea sunt proprietăți de mare însemnătate pentru rolul biomecanic al elastinei în corp [28, 45-48].

Elasticitatea reprezintă forța motrice pentru reculul spontan al extinderii elastinei și este entropică [49].

O caracteristică importantă pentru polimeri este temperatura tranziției vitroase (T_g). La temperatură joasă, un polimer poate fi rigid, sfărâmicos, iar cu ridicarea temperaturii, polimerul se comportă ca un elastomer sau ca un fluid vâscos.

Elastina suferă tranziția vitrosă în funcție de temperatură și de conținutul său de apă [50, 51].

În stare deshidratată, T_g este de aproximativ 200°C, iar la o hidratare de 30% este de circa 30°C [52]. Faza a doua de tranziție care se poate petrece cu tropoelastina, de asemenea, cu elastina propriu-zisă, este coacervarea.

La temperatura camerei, tropoelastina este solubilă în soluții apoase. Însă, cu ridicarea temperaturii, soluțiile devin tulburi datorită autoagregării moleculelor, ca rezultat al interacției între domeniile hidrofobe. Elastina pe bază de polipeptide, la care lipsesc domeniile hidrofobe ce formează legăturile transversale nu poate coacerva [50, 51].

Temperatura, concentrația în proteină, concentrația în sare și pH-ul au influență asupra comportării la coacervare, ca și prezența altor molecule ca glicozaminoglicanii [4, 55, 56].

Coacervarea este un proces de separare a unei soluții monofazice de compuși macromoleculari, ionici sau neionici, în două faze lichide ce se află în echilibru, una bogată în polimer și una foarte săracă în polimer. Faza bogată în polimer este denumită coacervat. Coacervarea poate avea loc prin schimbarea proprietăților solventului ca urmare a schimbării temperaturii, a adaosului de nesolvenți, de electroliți etc.

Coacervarea prin modificarea temperaturii, poate fi produsă ca urmare a

micșorării temperaturii, când separarea are loc la o temperatură critică superioară, cât și prin mărirea temperaturii, când separarea are loc la o temperatură critică inferioară. Faza bogată în polimer se prezintă sub forma unor picături microscopice. Cu timpul, are loc separarea în două faze microscopice ca urmare a coagulării particulelor fazei bogate.

Pierderea entalpiei din partea lanțului proteic este compensată prin eliberarea apei [56, 57].

Coacervarea este un proces de autoasamblare, cu toate că moleculele de tropoelastină se aliniază, *in vivo*, către legăturile transversale mai importante, probabil către aranjamentul picăturilor [3, 4, 58, 59].

13.5. PROPRIETĂȚILE FIZICE ȘI CHIMICE ALE ELASTINEI

Elastina, în stare umedă, are proprietățile fizice ale cauciucului reticulat, în timp ce în stare uscată este casantă, asemănătoare sticlei.

Elastina se umflă în diverși solvenți fără să treacă în soluție.

Modul de umflare a elastinei este prezentat în figura 13.2., unde este reprezentat grafic gradul de umflare volumetrică în diverși solvenți (de exemplu, formamidă, soluții de formamidă și apă, metanol, etanol, butanol), față de parametrul de solubilitate.

Gradul de umflare crește cu parametrul de solubilitate a solventului și atinge maximum la o anumită valoare a acestui parametru.

Parametrul de solubilitate (λ), definit ca fiind rădăcina pătrată a căldurii molare de vaporizare, măsoară tipul de interacții prezente în moleculele solventului.

Maximul punctului de umflare a unui polimer reticulat reprezintă compatibilitatea lui maximă cu solventul. Deci, parametrul de solubilitate al polimerului se presupune că ar fi identic cu cel al solventului, care indică un astfel de maxim.

Parametrul de solubilitate al elastinei, obținut din datele umflării este de aproximativ 19, corespunzând valorii solventului formamidă [12].

Studiile lui Lloyd și Partidge au indicat cantitativ că elastina se umflă în

acid formic, acid lactic, acid tioglicolic, în soluții apoase de salicilat de sodiu, tiouree, clorură de zinc și iodură de potasiu [12].

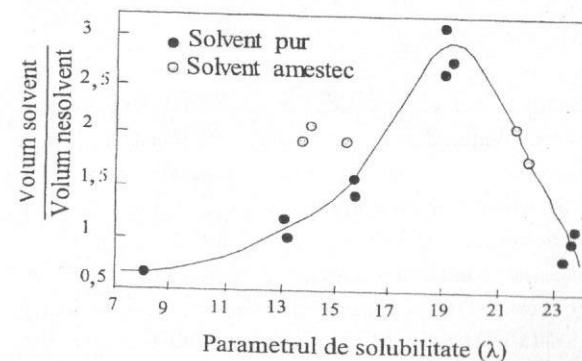


Fig. 13.2. Curba umflării volumetrice în funcție de parametrul solubilitate (λ) pentru elastina purificată din ligamentum nuchae ($T = 37^\circ\text{C}$) [12].

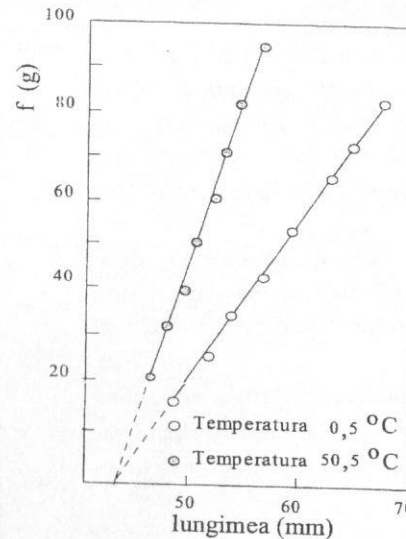


Fig. 13.3. Curbele de tensiune – deformare pentru ligamentum nuchae [60].

Cu toate că elastina se umflă în reactivii menționați, ea nu este solubilă în nici un reactiv fără o degradare considerabilă.

S-a constatat că peste un anumit prag de alungire a elastinei, curba de tensiune-deformație crește brusc. Acest fenomen a fost atribuit cristalinizării elastinei la o alungire mai mare. Totuși, studiată cu raze X, elastina întinsă nu indică nici un semn de cristalinitate.

C.A.J. Hoeve și P.J. Flory au întreprins un studiu al comportării tensiune-deformare a ligamentului nuchae într-un amestec de glicol-apă, unde concentrația gicolului a fost de 30%, la temperaturi de 0,5° și 50,5°C (Fig. 13.3.). În urma acestui studiu, a rezultat că fibrele de elastină se comportă foarte asemănător cu un cauciuc ideal, iar elasticitatea este de natură entropică [12, 60].

13.6. ELASTAZELE ȘI ACȚIUNEA LOR ASUPRA ELASTINEI

Principalele elastaze sunt cele de natură *pancreatică* și *bacteriană*.

Elastaza pancreatică este un complex enzimatic polifuncțional. Cu ajutorul cromatografiei pe coloană de DEAE-Sephadex, în elastază, s-au identificat cinci fracții, din care *trei mucoproteineze (mucoinaze)* au acțiune mucolitică, *o elastoproteinază* și *o elastolipoproteinază*.

Elastaza pancreatică este solubilă în apă, în stare pură are $pH_i = 8,5-9,5$ și masa moleculară de 25000–28000.

Elastoproteinaza are o dublă activitate proteolitică: una specifică (*elastoliza*) și alta nespecifică. Elastoliza constă într-un proces de depolimerizare, cu transformarea elastinei fibroase, insolubile, în elastină globulară, solubilă, care, în condiții optime, ar trebui să devină tropoelastina, care s-a atașat la structura extracelulară existentă în matrixul extracelular, după trecerea sa din celulă în mediul extracelular. Are loc o proteoliză asupra legăturilor transversale din elastina insolubilă, dar se produc și rupe de legături peptidice din structura lanțurilor polipeptidice ale elastinei, aceasta în funcție de intensitatea elastolizei.

Activitatea nespecifică a elastoproteinazei diferă de cea a tripsinei, chimotripsinei și a carboxipeptidazei, prin faptul că hidrolizează a serie de substrate

ca albumina, cazeina, fibrina, fibrinogenul, hemoglobina sau collagenul denaturat.

Activitatea elastazei este inhibată de săruri ca NaCl și de ioni de cupru bivalent, în concentrație de $10^{-3}M$. Aceștia sunt dintre cei mai puternici inhibitori ai elastazei pancreatice. Electroliții au influență numai asupra activității elastolitice, în timp ce activitatea proteolitică nespecifică pare, practic, nemodificată.

Elastomucaza produce scindarea componentei glucidice din complexul macromolecular al elastinei, exercitând în același timp și un efect sinergic elastolitic.

Elastomucaza are o masă moleculară de aproximativ 25000 și un pH optim de acțiune în jur de 7,8. În constituția chimică a elastomucazei, s-a identificat o cantitate însemnată de acid sialic.

Elastolipoproteinaza are acțiune *esterolitică* asupra componentei lipidice din elastină și se prezintă ca o β -globulină.

Elastaza bacteriană a fost identificată, mai întâi, în filtratul de cultură de *Pseudomonas pyocyanea* și apoi în culturile altor bacterii ca: *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*, ca și în culturile de fungii (*Actinomyces*, *Streptomyces*). Aceste preparate conțin însă și proteinaze și peptidaze nespecifice. Singura elastază bacteriană izolată, cu un grad mai mare de puritate, este cea produsă în cultura de *Flavobacterium estolyticum*.

Masa moleculară a elastazei bacteriene pare să fie mai mare decât a celei pancreatice, iar pH-ul optim de acțiune este de aproximativ 7,4.

Elastaza bacteriană, la hidroliză, scindează legătura peptidică dintre prolină și glicină.

13.7. RETICULĂRILE DINTRE ELASTINĂ ȘI COLAGEN

Elastina și collagenul sunt două proteine fibroase principale ale țesutului conjunctiv, fiecare având funcții distincte.

Fibrele de collagen aproape că nu se întind, dar au o mare rezistență mecanică.

Elastina permite deformarea reversibilă a țesutului.

Ea este prezentă în cantități mari, acolo unde țesuturile sunt supuse deformării periodice și regulate, așa cum sunt arterele, plămânii și pielea. Elastina, când se hidratează, poate fi întinsă de două sau de trei ori lungimea sa, iar la încetarea efortului de întindere își revine la forma inițială. În stare uscată, elastina este casantă.

Elastina este mai insolubilă decât collagenul. Ea reprezintă reziduul care rămâne în urma extracției tuturor proteinelor și neproteinelor.

La tratarea collagenului, în capitolul 12, ca și la tratarea elastinei în capitolul de față, s-au prezentat reticulările care pot avea loc în structura celor două proteine fibroase.

Collagenul și elastina se găsesc împreună în alcătuirea diferitelor organe, realizându-se, astfel, caracteristicile funcționale ale acestora. De aceea, o serie de legături transversale intermoleculare caracteristice ale collagenului sau ale elastinei se formează și între cele două proteine fibroase.

Wiederhorn și colaboratorii au elaborat o ecuație bazată pe comportarea tensiune-deformare a collagenului denaturat termic (tendon de coadă de cangur), pe baza căreia se poate calcula masa medie moleculară a catenei polimerului între punctele de joncțiune (densitatea reticulărilor):

$$F = \left(\frac{RTp \cdot v_2^{1/3}}{M_c} \right) \left(\alpha - \frac{1}{2} \right)$$

unde:

F este forța reactivă pe unitatea de suprafață;

T este temperatura absolută;

R este constanta gazelor;

α este raportul dintre lungimea la întindere și lungimea inițială;

p este densitatea elastomerului uscat;

v_2 este fracțiunea de volum a elastomerului din compoziția care urmează să fie deformată;

M_c este masa moleculară medie dintre reticulări.

S-a subliniat că ecuația nu presupune nici o modificare a energiei interne cu lungimea, adică nu există nici o forță de atracție sau respingere intermoleculară dintre diferitele grupe de pe catene, deci baza pentru efectuarea măsurătorilor temperaturii de denaturare. După condițiile definite de Wienderhorn și colaboratorii, M_c este, evident, mai curând o măsură a legăturilor covalente decât a legăturilor de hidrogen sau ionice.

M_c s-a măsurat pentru trei serii diferite de tendoane de cozi, considerate ca fiind o preparație aproape pură de collagen și s-a evaluat că ar fi cam de 55000 ± 5000 sau 594 de resturi de aminoacizi între reticulări.

Gotte și colaboratorii au analizat fâșii de ligamentum nuchae, purificate cu alcalii, presupuse ca elastină pură și au obținut, o valoare a M_c de 3000 sau circa 30 de resturi de aminoacizi între reticulări.

Bowes și Cater au estimat M_c pentru tendonul cozii de cangur și au arătat că se găsește între 190000 și 375000 sau 0,4 până la 0,8 reticulări / helix.

Se presupune că metoda măsoară numai reticulări în exces față de cele necesare, pentru a da o rețea polimerică continuă, de un minimum de două reticulări intramoleculare și o reticulare intermoleculară. În consecință, s-a estimat că există între 3,4 și 3,8 reticulări pe cele trei catene ale moleculei de collagen.

Cater a reticulat collagenul din tendonul de cangur cu diverse aldehide și a obținut valori pentru M_c de 4000, indicând un număr de reticulări de 10–12 la o moleculă de collagen.

Alt procedeu utilizat în mod curent și care se consideră că reflectă gradul de reticulare a collagenului și a elastinei este contracția termică, exprimată prin temperatura de contracție.

În general, legăturile covalente nu sunt afectate de temperaturile necesare pentru contracție.

După Gustavson, contracția termică a fibrelor de collagen depinde de numărul de reticulări prezente în proteină, dar este, de asemenea, influențată și de mulți alți factori, cum ar fi împletitura de fibrili a rețelei și structura fibrei care include componenți necolagenici.

Reticularea artificială, de exemplu tăbăcirea, ridică temperatura de con-

tracție a țesuturilor colagenice și se datorește formării, în special, a reticulărilor covalente.

Toate concluziile la care s-a ajuns cu privire la modificările densității reticulării colagenului și elastinei, datorită diferitelor cauze, se bazează pe dovezi indirecte provenite din aprecierea proprietăților fizice, cum ar fi contracția termică, rezistența la întindere, umflarea în soluții apoase, termodegradarea, modelul difracției cu raze X și elasticitatea țesuturilor bogate în elastină sau collagen.

Alte dovezi indirecte în cazul colagenului se obțin din estimările proprietăților relative ale fracțiunilor solubile și insolubile, care reflectă gradul de reticulare intermoleculară.

O grupă de compuși administrată, mai ales, animalelor tinere produc modificări în structura țesutului conjunctiv: *latirogenii*.

Latirogenii sunt substanțe care împiedică formarea legăturilor transversale ale colagenului și elastinei, *in vivo*, prin inhibarea lizin-oxidazei (protein-lizin-6 oxidaza). Această enzimă acționează prin dezaminarea grupelor ε-aminice ale unor resturi de lizină și hidroxilizină, rezultând formarea derivaților lor aldehydici. Aceștia se pot reticula neenzimatic cu resturi de lizină sau hidroxilizină din vecinătatea lanțurilor de collagen prin formarea de baze Schiff sau prin condensări aldol mai stabile la tracțiune [158,159]. Reacții similare au loc la legăturile transversale ale elastinei [160].

Enzimele au doi cofactori obligatorii, de exemplu cupru [161–163] și derivați de piridoxal [164–167].

Schimbările la embrionii de pui latirici includ o fragmentare remarcabilă a țesutului conjunctiv și creșterea solubilității în soluții saline a colagenului și elastinei.

Creșterea solubilității colagenului și elastinei la animalele tinere poate rezulta din avulsia (luxarea) tendonului de pe os, alunecarea epifizei, subluxația lentilelor ochilor din ligamentele lor suspensoare, severe deformații ale scheletului și, frecvent, moartea datorită rupturii aortice.

Latirogenii pot fi împărțiți în patru grupe după structura lor chimică (tabelul 13.2) [168].

Tabelul 13.2.

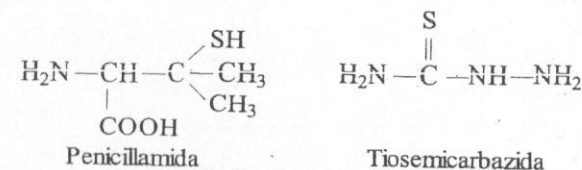
Exemple din cele patru grupe de latirogeni

Grupa de latirogeni	Exemple
Nitrili organici	β-Aminopropionitril (BAPN)
Ureide (legături C–N)	Semicarbazide (SCH)
Hidrazide (legături C–C)	Acid izonicotinic hidrazidă (INAH, Izoniazidă)
Hidrazină hidrat și unii derivați	Hidrazină – hidrat
$\text{NH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CN}$	$\text{NH}_2 - \text{NH} - \text{CO} - \text{NH}_2$
β-Aminopropionitril (BAPN)	Semicarbazidă (SCH)
$\text{NH}_2 - \text{NH}_2, \text{H}_2\text{O}$	$\text{NH}_2 - \text{NH} - \text{CO}$
Hidrat de hidrazină	Izoniazidă 

Piridoxalul (vitamina B₆) este capabil de a contracara efectul latirogenic al izoniazidei (INAH) în embrionul de pui, *in vivo* [169, 170] și aducerea, aproape de normal, a rezistenței colagenului degradat.

Primul dintre latirogenii care a fost cunoscut este β-aminopropionitrilul (BAPN) izolat dintr-o varietate de mazăre dulce, *Lathyrus odoratus*.

În afară de latirogenii amintiți mai sus, se menționează și *penicillamina* și *tiosemicarbazida*.



Penicillamina se combină, *in vivo*, cu grupele aldehydice ale moleculei de

colagen împiedicând, prin aceasta, formarea de reticulări.

Tiosemicarbazida reacționează ca și BAPN, prin aceea că inhibă formarea enzimatică în colagen și elastină a aldehidei, împiedicând formarea de legături transversale.

13.8. IMPLICAȚIILE ELASTINEI ÎN PROCESUL DE ÎMBĂTRÂNIRE

Elastina are un rol însemnat în procesul de îmbătrânire a organismului, dar nu este decât un component al acestui proces. În organism se constată o înpuținare a fibrelor elastice cu vârsta, modificări în structura lanțurilor sale polipeptidice și chiar o deteriorare a elastinei, au loc fenomene la nivelul celulelor care premerg biosinteza tropoelastinei.

Compoziția în aminoacizi elastinei variază cu vârsta, are loc creșterea raportului între aminoacizii polari și nepolari. Glicina și prolina rămân neschimbate; aminoacizii apolari: alanina, izoleucina, leucina și valina scad foarte mult; lizina, de asemenea, înregistrează o scădere; aminoacizii: hidroxiprolina, acidul aspartic, serina, treonina, arginina și histidina înregistrează creșteri semnificative (tabelul 13.3.).

Tabelul 13.3.

Variația conținutului în aminoacizi din aorta bovinelor bătrâne
(g aminoacizi / 100 g proteină)

Aminoacizi cu conținut crescut		Aminoacizi cu conținut redus	
Hidroxiprolină	4	Alanină	0,8
Acid aspartic	4	Leucină	0,9
Treonină	3	Izoleucină	0,5
Serină	2	Valină	0,9
Arginină	5	Lizină	0,1
Histidină	5		

Modificările produse asupra elastinei cu vârsta sunt mult mai evidente în componentele organelor unde se găsește în cantitate mai mare (artere, plămâni, cartilaj, ligamente, vezica urinară etc). Se poate spune că deteriorarea elastinei

contribuie la declinul multor organe.

Elastina se combină cu calciul și cu lipidele sanguine. Conținutul de calciu în aortele tinere este în medie de 0,35%, în timp ce în aortele bătrâne ajunge, în medie, până la 5,95%.

Se produce rigidizarea pereților aortei (care conțin până la 40% elastină), are loc sclerozarea aortelor (arterioscleroza). În procesul de îmbătrânire elastina afectează bronhiile, diminuându-se capacitatea pulmonară (plămânii conțin în medie 30% elastină). Este o cauză pentru care sportivii de înaltă performanță nu mai pot da randamente optime după vârste în jur de 30 de ani. Pierderea de elastină explică îmbătrânirea cristalinului ochiului, care după vârsta de 40 de ani, începe să-și piardă suplețea, de unde apar dificultăți de citire, se instalează presbitismul. Din cauza pierderii de elastină are loc și slăbirea pielii.

Hayflick a constatat, *in vitro*, că fibroblastele se reproduc numai de aproximativ 50 de ori, iar alte cercetări arată că reproducerea este în jur de 70 de ori. Aceasta este o explicație însemnată a scăderii conținutului de elastină, ca și de colagen cu creșterea vârstei.

Cu îmbătrânirea, apar alterări în structura și funcțiile vaselor sanguine. Se produc schimbări în pereții vasculari și în fibrele elastice. Peptidele de elastină derivate din degradarea elastinei sunt prezente în serum uman și sunt capabile de a induce efecte biologice diverse, influențând fibroblastele, celulele fagocitare, limfocitele, celulele mușchilor netezi și celulele endoteliale prin mijlocirea receptorului elastină-laminină.

Căile de transducție (transformare a unei forme de energie în alta prin mecanisme senzoriale ale corpului) a receptorului elastină-laminină implică activarea fosfolipazei C printr-o proteină G sensibilă la toxina pertussis. Fosfolipaza C induce, pe de o parte, producția de inositol trifosfat, având ca efect creșterea calciului liber intracelular și, pe de altă parte, pe cea de diacilglicerol care stimulează translocarea la membrană a proteinei kinaza C, conducând la rândul său la fosforilarea membrilor familiei de kinaze C.

Un decupaj progresiv al receptorului elastină-laminină survine cu îmbătrânirea, ceea ce alterează căile de transducție a receptorului elastină-laminină,

ducând la o alterare a metabolismului calciului intracelular și la o pierdere de homeostazie calcică a celulei. Aceste alterări în transducția semnalelor receptorului de elastină-laminină au drept consecință modificarea activităților celulelor parenchimotoase și fagocitare odată cu îmbătrânirea, producția de radicali liberi, eliberarea elastazei. Așadar, aceste alterări care survin în cursul îmbătrânirii, în semnalizarea receptorului elastină-laminină, care rezultă în disfuncția celulară, pot contribui semnificativ la dezvoltarea arterosclerozei.

Profunde schimbări se produc în derm, schimbări care sunt importante și pentru faptul că reînnoirea proteinelor dermului este lentă.

Numărul fibroblastelor din derm se micșorează la jumătate în perioada dintre 20 și 80 de ani. Fibroblastele, care asigură un echilibru între sinteza, maturizarea și degradarea fibrelor de collagen și elastină și distrugerea lor de către collagenaze și elastaze, deplasează acest echilibru spre degradarea fibrelor de collagen și de elastină. Are loc o pierdere de elasticitate și de tonicitate a dermului.

Dungile, urmele mai roșiatice de pe piele, sunt o dereglare care afectează în principal fibrele elastice. Dermul pierde capacitățile de rezistență și extensibilitate și în consecință devine susceptibil la rupturi ale fibrelor de collagen. Dungile sunt depresiuni cutanate liniare ale dermului, orientate paralel la liniile de tensiune cutanată, caracterizate printr-o epidermă mai fină, dar peste tot o diminuare a densității rețelei de fibre elastice.

13.9. ELASTINA CA BIOMATERIAL

Rolul biologic al elastinei. Elastina nativă este o proteină extrem de insolubilă a matrixului. Ea asigură extensibilitatea și mobilitatea celor mai multe țesuturi ale corpului.

Cunoașterea mecanismului asamblării elastinei native este limitat. Ea se găsește în apropierea membranei celulare unde microfibriliile se găsesc în fascicule de fibre. Elastina amorfă este sintetizată de celulele mușchilor netezi, ca monomeri solubili, precursorii tropoelastinei, și este organizată în rețele insolubile [172, 173].

Compoziția caracteristică a tropoelastinei dă proprietățile fizice ale acestei structuri proteice. Topoelastina este bogată în glicină (33%), prolină [10-12] și alte resturi hidrofobe (44%) care dau elastinei o deosebită hidrofobicitate.

Tropoelastina conține zone cu reticulări și zone hidrofobe. Domeniile cu reticulări conțin perechi de lizină care produc reticulările intermoleculare. Domeniile hidrofobe conțin circa 75% resturi de glicină, prolină, alanină și valină.

Încorporarea elastinei în biomateriale urmărește exploatarea proprietăților sale legate, mai ales, de elasticitate și de efectele sale biologice. Importanța acestei proteine fibroase pentru biomateriale este materializată printr-o serie de aplicații și este în atenția multor colective de cercetare cu perspective certe de dezvoltare.

Elastina poate fi folosită ca biomaterial sub formă de elastină insolubilă pentru autogrefe, alogrefe, xenogrefoane, matrix extracelular decelularizat și în diferite preparate ca elastină purificată.

Elastina insolubilă poate fi hidrolizată pentru obținerea de preparate cu elastină solubilă.

Elastina cu secvențe de aminoacizi, care se repetă, poate fi produsă pe cale de sinteză sau recombinantă. De asemenea, fragmente de tropo-elastină și de tropoelastină recombinantă pot fi folosite ca biomateriale.

Diferitele forme sub care se găsește elastina pot fi grupate în: *elastine naturale și elastine biosintetice și sintetice.*

(Notă: *recombinant* = *recombinat*, descrie o celulă nouă sau un compus care rezultă dintr-o recombinare genetică).

Formele naturale de elastină [5] sunt:

- *Țesut decelularizat* obținut prin variate metode de extracție, cu masă moleculară înaltă [61-63].
- *Elastină insolubilă* obținută prin purificare, cu masă moleculară înaltă [64-67].
- *Tropoelastină*, obținută prin extracție, cu masa moleculară de ~72 kDa [68, 69].
- *Elastină hidrolizată*, care este de mai multe tipuri ce diferă după modul de hidroliză și masa moleculară: α -elastină, solubilizată cu acid oxalic și

cu masa moleculară medie de 60 kDa [70, 71]; β -elastină, solubilizată cu acid oxalic și masa moleculară medie de 10 kDa [70, 71]; κ -elastina, solubilizată cu KOH și masa moleculară medie de 70 kDa [72]; *produs solubilizat cu pepsină (PSP)* și masa moleculară medie de 25 kDa [73]; *produs solubilizat cu acid (PSA)*, masa moleculară medie de 25 kDa [73]; *produs solubilizat cu elastază (PSE)*, amestec eterogen [74].

Formele biosintetice și sintetice de elastină (Nu conțin legături transversale naturale de desmozină și izodesmozină) [5].

- *Tropoelastina* recombinantă (E.coli), masa moleculară ~72 kDa [75-78].
- *Fragmente de tropoelastină* recombinante (Eschericia coli), masa moleculară ~3 kDa până la ~31 kDa, care depind de numărul de exoni și exoni repetați [65, 79].
- *Elastină de polipeptide (bloc polimeri)* se obține prin sinteză chimică sau recombinantă (E.coli), masa moleculară depinde de mărimea peptidelor și de numărul de repetări [81-84].
- *Hibrizi cu alte molecule*, de exemplu, elastină-fibronectină, recombinanți (E.coli), masa moleculară depinde de mărimea blocului polimer și de repetare [71, 85].
- *Bloc polimeri, subtipul, mătase-elastină*, recombinant (E.coli), masa moleculară depinde de mărimea blocului și de repetare [86, 87].
- *Bloc polimeri, subtipul, elastină-polimer sintetic*, se obține prin sinteză chimică sau recombinat (E.coli), masa moleculară depinde de mărimea blocului polimer și de repetare [88, 89].

13.9.1. BIOMATERIALE DERIVATE DE LA ELASTINE NATURALE

13.9.1.1. ȚESUTURI DECELULARIZATE CARE CONȚIN ELASTINĂ

Țesut decelularizat este un fragment de țesut conjunctiv bogat în elastină, care a fost supus îndepărtării celulelor, în așa fel încât, să-și păstreze forma tridimensională a arhitecturii, conservându-se, pe cât posibil, scheletul matrixului extracelular [5]. Îndepărtarea celulelor din aceste țesuturi este ne-cesară deoarece fragmentele celulare conduc irevocabil la un răspuns imuno-logic.

Țesuturile decelularizate interesează în primul rând chirurgia pentru grefe vasculare.

Un exemplu de decelularizare a unui țesut bogat în elastină este decelularizarea unor fragmente de artere carotide de la porcine, fără a se afecta scheletul matricei extracelular, urmărindu-se efectele acestui proces asupra proprietăților biomecanice ale arterelor carotide [90].

Fragmente de artere carotide s-au recoltat de la porci de 150-200 kg, după maximum 15 minute de la sacrificare. S-au spălat imediat cu soluție tampon fosfat cu gheață și, apoi, în soluție tampon fosfat cu gheață, în maximum 30 minute, au fost predate laboratorului [91, 92].

Dcelularizarea s-a desfășurat în patru etape, prin procedeul detergent-enzimatic utilizându-se Triton X-100 și sodiu dodecil sulfat (SDS).

Triton X-100 este izooctilfenoxipolietoxietanol-detergent neionic.

În prima etapă, care nu produce efecte de denaturare a elementelor celulare, arterele s-au imersat într-o soluție tampon hipotonică (soluție cu o presiune osmotică mai mică decât cea a soluției cu care se compară), care a conținut 10 Mm Tris, pH=8, împreună cu inhibitori de protează, sub continuă agitare, timp de 48 ore, la 4°C.

În etapa a doua, tamponul hipotonic s-a înlocuit cu un tampon hipertonic, care a conținut: 1 % Triton X-100, 1,5 M KCl, 10,0 Mm Tris, pH=8,0, cu inhibitori de protează sub aceeași agitare continuă. Apoi, arterele s-au spălat intens cu 0,15 M tampon fosfat, pH=7,3.

Etapa a treia este incubarea cu dezoxiribonuclează, 0,2 mg/ml și ribonuclează, 20 μg/ml, 37°C, timp de 5 ore. După o spălare cu tampon fosfat, ultima extracție a tamponului a conținut 1% SDS și 10,0 Mm Tris, pH=9, timp de 48 ore, la temperatura camerei, sub continuă agitare, după care în aceeași flotă, probele de artere carotide s-au fixat cu 4% formaldehidă și s-au pregătit pentru analiză histologică, rezistența la rupere, măsurătorile biomecanice.

Procesul de decelularizare conduce la modificări în geometria suprafeței și a structurii. Se produce o creștere semnificativă a diametrului arterelor, o scădere a grosimii peretelui lor și o creștere de 10-12% a lungimii. Modulul de elasticitate are o creștere semnificativă la arterele decelularizate, în compa-

rație cu cele normale. Prezența fibrelor de colagen conduce la rigidizarea vaselor, care oricum sunt capabile să reziste la presiunea la care sunt supuse.

Analiza histologică a probelor (Fig.13.4) [90] pune în evidență efectul decelularizării arterelor carotide de porc.

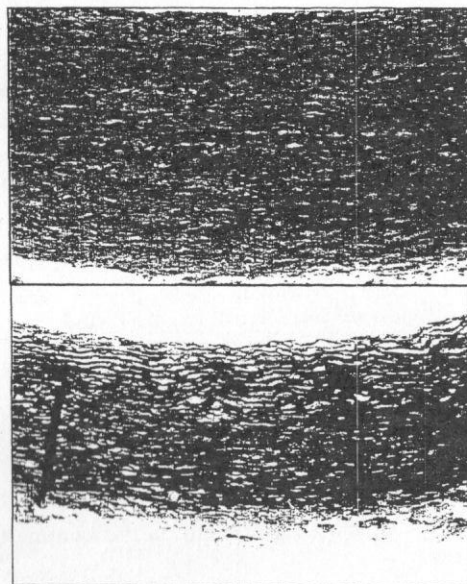


Fig.13.4. Secțiune longitudinală a arterei carotide de porc. Figura de sus, înainte de decelularizare; figura de jos, după decelularizare (mărire, 20x) [90].

13.9.1.2. PURIFICAREA ELASTINEI

Elastina asigură elasticitatea organelor ca: plămânul, aorta, ligamentele. Ea este sintetizată ca precursor solubil (tropoelastina), 72 kDa, care suferă modificări translaționale rezultate din formarea unor legături transversale interlanțuri prin intermediul desmozinei, izodesmozinei, lizin-norleucinei, de-

hidrolizin-norleucinei [11, 22, 93]. Întotdeauna, 5 până la 34 resturi de lizină ale tropoelastinei participă la legăturile transversale și rezultă un polimer insolubil în care legăturile transversale derivate din lizină conțin circa 65–70 resturi [94].

Fibra elastică este compusă din două entități: elastina amorfă și microfibrili. În timpul formării fibrei elastice, componenții microfibrilari acționează ca un schelet pe care este depusă elastina [95].

Pentru ca elastina să aibă cât mai multe utilizări ca biomaterial, trebuie să fie cât mai bine purificată [96–100]. În literatura de specialitate sunt prezentate diferite procedee de purificare a elastinei, precum și variate metode de analiză a gradului său de purificare (Fig.13.5.).

Pentru purificarea elastinei, s-a plecat de la o probă omogenă de ligamentum nuchae și s-au aplicat mai multe procedee de purificare elaborate de diferiți cercetători [93], pentru a se putea recomanda metoda cea mai performantă.

Primul procedeu adaptat după A.I. Lansing, T.B. Rosenthal, M. Alex și W. Dempsey [101], constă în trei extracții de câte 24 ore cu 10 vol. 1 M NaCl, la 4°C a materialului supus purificării.

După fiecare extracție materialul a fost centrifugat la 13000g, la 4°C, timp de 20 min. După ultima extracție, materialul supus purificării s-a spălat cu apă demineralizată și s-a degresat cu 30 vol. acetonă (de trei ori câte o oră). Apoi, s-a supus uscării în exicator, s-a suspendat în 30 vol. 0,1 M NaOH și s-a încălzit la 95°C pentru 45 minute.

Suspensia s-a răcit, s-a spălat cu apă demineralizată și s-a liofilizat.

În al II-a procedeu adaptat după B.L. Rasmussen, E. Bruenger and L.B. Sandberg [102], materialul luat spre purificare s-a supus extracției cu 10 vol. de 5 M clorură de guanidinium, care a conținut 1% mercaptoetanol (pH=7) pentru 24 ore.

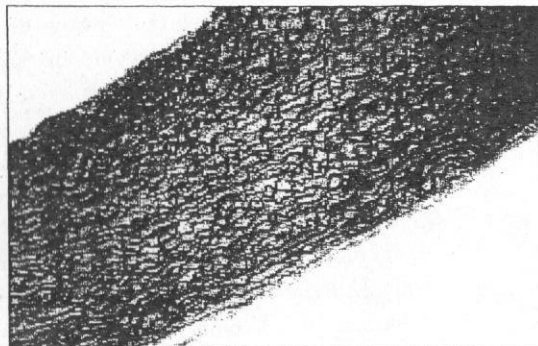


Fig.13.5. Fibre elastice din peretele aortei

Mixtura a fost diluată de 4 ori cu apă demineralizată și centrifugată la 13000 g, timp de 20 min. Materialul supus purificării s-a suspendat în 20 vol. de apă și s-a autoclavizat timp de 5 ore, la temperatura de 120°C.

Mixtura s-a filtrat și fierbinte s-a spălat cu apă la fierbere de 3 ori cu câte 20 vol., s-a filtrat și s-a uscat în exicator. Materialul uscat s-a suspendat în 40 vol. de acid formic de 97%, în care s-a adăugat 1% bromură de cianogen și s-a lăsat în repaos 24 ore.

Mixtura s-a diluat apoi cu 4 vol. de apă demineralizată, s-a filtrat, s-a spălat cu apă demineralizată la pH = 6 și s-a liofilizat.

Procedeul al III-a a., adaptat după R. John și J. Thomas [103], constă din diferite extracții și digestii cu enzime. Proba de material elastic supusă purificării s-a extras de 3 ori, peste noapte, cu 10 vol. de 1 Mol NaCl, care a conținut 0,02 % NaN_3 , la temperatura de 4°C.

După fiecare extracție proba s-a recuperat prin centrifugare la 13000 g, la temperatura de 4°C, timp de 20 min. apoi, s-a spălat cu apă demineralizată și s-a suspendat în 10 vol. etanol pentru 90 min. Mixtura s-a filtrat și apoi s-a resuspendat în 10 vol. cloroform/meta-nol (2:1) pentru 90 min. A urmat o filtrare și s-a resuspendat în 10 vol de acetonă pentru 30 min și aceeași procedură s-a repetat cu 10 vol. de eter.

Materialul supus purificării s-a uscat în exicator, apoi s-a extras de 3 ori cu câte 10 vol. de 5 M clorură de guanidinium, care conține 0,02% NaN_3 (pH=7) pentru 24 ore. După ultima extracție, materialul supus purificării s-a spălat cu apă demineralizată și s-a incubat 48 ore, la 37°C, cu 1000 U collagenază/g substrat în 10 vol. de 0,2 M Tris HCl (pH=7,4) conținând 0,05 M CaCl_2 și 0,02 % NaN_3 ; după 24 ore s-a adăugat alte 250 U collagenază/g substrat. Enzima s-a inactivat apoi prin adăugare de EDTA (concentrația finală, 25 mM). Preparatul s-a spălat cu apă demineralizată și între spălări s-a recuperat prin centrifugare la 13.000 g, timp de 20 min.

După ultima spălare, materialul supus purificării s-a resuspendat în 10 vol. de 0,1 M NH_4HCO_3 (pH=8,2) conținând 0,02% NaN_3 și 1000 U tripsină pentru 4 ore la 37°C.

Reacția s-a stopat cu fluorură de fenilmetilsulfonil (PMSF; concentrația finală fiind de 1,86 mM).

Materialul supus purificării s-a spălat cu apă demineralizată, apoi s-a continuat prin trei extracții, peste noapte, cu câte 10 vol. 1 M NaCl, care a conținut 0,02 % NaN_3 și s-a spălat din nou cu apă demineralizată.

La sfârșit materialul s-a liofilizat.

Procedeul al III-a b., se aseamănă cu procedeul 3a dar conține trei modificări.

Prima modificare urmărește îndepărtarea mai multor compuși neelastici și s-a adăugat după 24 ore 500U collagenază/g în loc de 250U/g.

A doua modificare, după spălarea tripsinei și PMSF, materialul supus purificării este pus pentru 24 ore în 5 vol. de acid formic 97% și cu adaos de 1% bromură de cianogen. Mixtura s-a diluat apoi cu 4 volume de apă demineralizată, s-a filtrat și spălat cu apă demineralizată la pH = 6.

A treia modificare constă în introducerea unui tratament, peste noapte, cu 0,5 M TrisHCl (pH=6,8), conținând 1 M 2-mercaptoetanol și 0,02 NaN_3 . Materialul de purificat s-a spălat și extracțiile cu NaCl s-au îndepărtat.

Procedeul al III-a c., modificat din procedeul 3b. Purificarea conține aceleași etape ale procedurii 3b, dar într-o ordine diferită. După trei extracții

cu 1M NaCl și diferite extracții de substanțe grase, etapa cu bromură de cianogen a fost îndepărtată. După spălare, materialul supus purificării s-a extras de trei ori, câte 24 ore, cu 0,5 M Tris HCl, conținând 5 M clorură de guanidium, 1M 2-mercaptoetanol și 0,02 NaN₃ (pH=6,8).

După spălare, digestiile cu collagenază și tripsină au fost îndepărtate. Nu s-au folosit inhibitorii pentru enzime. Etapa finală a constat din trei extracții cu 1 M NaCl, conținând 0,02 % NaN₃ și spălarea cu apă demineralizată.

Preparatele de elastină purificată s-au depozitat la temperatura de -80°C.

Puritatea elastinei purificate s-a determinat utilizând electroforeza cu gel de sodiu dodecil sulfat poliacrilamidă, analiza aminoacizilor, conținutul în sulfhidril, microscopia imunofluorescentă.

Pe baza analizelor de laborator s-a dovedit că toate metodele de purificare menționate duc la un grad de purificare apropiat și acceptabil [93]. A fost izolată elastină din aortă [61], ligamentum nuchae de la bovine și cabaline, plămân [104], piele [185].

13.9.1.3. ELASTINA HIDROLIZATĂ

Elastina hidrolizată, denumită și *elastină solubilizată* sau *peptide de elastină* este un produs mult folosit pentru biomateriale.

La prepararea elastinei solubile, cel mai frecvent se folosește tratamentul cu 0,25 M acid oxalic la temperatura de 100°C și cu 1 Mol KOH în 80% etanol la temperatura de 37°C [70, 72].

Pentru obținerea elastinei solubile se pot folosi metode enzimatic bazate pe hidroliza unor legături peptidice ale elastinei insolubile [74, 106, 107].

Elastina solubilă, obținută după hidroliza cu acid oxalic, poate fi coacervată după suspendarea în soluție de acid acetic la pH=5,5, în care s-a adăugat acetat de sodiu și NaCl, urmată de încălzire și centrifugare la temperatura de 37°C. Se formează două fracțiuni: α -elastina, un coacervat vâscos, și β -elastina, în supernatant [55].

Folosind KOH, se formează κ -elastina care este un amestec eterogen de peptide de elastină, cu masa moleculară medie de ~70kDa, solubil în soluție apoasă [72].

Biomaterialele care conțin elastina solubilizată pot exercita efecte biologice (de exemplu, creșterea sintezei elastinei) într-o mare varietate de tipuri de celule și este benefică mai ales când se pot realiza aceste efecte într-o perioadă mai lungă de timp.

Materialele pe bază de κ -elastină sau fibre de elastină cu collagen tip I și III pot fi preparate în combinație cu glicozaminoglicani sau fosfat de calciu [108-113]. S-au realizat preparatele de elastină solubilă combinate cu fibrina [114]. Potențialul materialelor collagen-elastină și collagen-fibrină a fost evaluat pe modele *in vivo*, de exemplu, la membrana timpanică [115] și la dura mater (membrană externă meningeală a creierului și măduvei spinării [115, 116].

Elastina solubilizată poate fi folosită la îmbunătățirea biocompatibilității materialelor sintetice ca polietilenglicoltereftalatul (PET) [117].

13.9.2. BIOMATERIALE DERIVATE DE LA ELASTINE BIOSINTETICE

La producerea elastinelor biosintetice și sintetice se poate realiza: secvența dorită a aminoacizilor, lungimea polipeptidelor și în cazul prezenței bloc polimerilor, lungimea și numărul acestora.

Secvența specifică a aminoacizilor are efecte biologice celulare, așa cum este cazul secvenței Arg-Gly-Asp [118].

Noțiunea sisteme recombinante rezultă de la preparatele proteice foarte omogene (compoziția, secvența și masa moleculară), spre deosebire de moleculele preparate din peptide de sinteză [119,120].

13.9.2.1. TROPOELASTINA BIOSINTETICĂ

Tropoelastina poate fi produsă în condiții bune prin tehnici ale biologiei moleculare [68, 69, 75].

Tropoelastina (bio) sintetică nu conține legături transversale în contrast cu elastina purificată din fibre. Dar este posibil de a se face astfel de legături, utilizând enzima lizil-oxidaza în absența altor molecule [121]. Capacitatea aces-

tor elastine de a se autoasambla a fost utilizată la producerea unor biomateriale ca: bureți, în formă de strat, filme, tuburi. Tuburile s-au realizat prin înfășurarea straturilor de elastină

13.9.2.2. FAGMENTE DE TROPOELASTINĂ

Fragmente de molecule de tropoelastină umană exprimat pot, asemenea autoagregatelor, să formaze coacervate [79]. Trei domenii hidrofobe care flanchează două domenii cu legături transversale sunt suficiente pentru a se realiza autoasamblarea [32]. Elastina umană pe bază de peptide la secvențele exonilor 20–(21–22–23)₂ a genei elastinei [hidrofob (20 și 24) – legătură transversală (21–22)] formează spontan matricea fibrilară după coacervare [54].

Fragmentele de tropoelastină bazate pe exonii 20–(21–23–24)₂ pot avea potențial în a inhiba tromboza în grefele vasculare, iar aplicarea lor ca înveliș a fost cercetată pentru materialele sintetice. *In vitro*, lipirea și activarea trombocitelor s-a redus semnificativ [123].

13.9.2.3. POLIMERI ASEMENEA ELASTINEI

Polimeri asemenea elastinei sunt polipeptide nenaturale, compuse din secvențe care se repetă. Asemenea secvențe își au originea în proteinele elastice de la mamifere și care conferă elasticitate unor structuri ca în piele și vasele de sânge.

Cele mai lungi și deosebite secvențe de peptide, între reticulări la porcine și bovine sunt: (Val.Pro.Gly.Val.Gly)₁₁ [174, 175]. Sunt și alte secvențe care se repetă, ca: (Val.Pro.Gly.Gly)_n, (Ala.Pro.Gly.Val.Gly.Val)_n [176, 177].

Importanța acestor polimeri rezidă în faptul că prezintă un șir amplu și multilateral de proprietăți, care fac să fie utilizați în scopuri biomedicale și în nanobiotehnologii [178, 179].

D.W. Urry și colaboratorii au arătat că proprietățile fizice ale elastinei cu polipeptide care se repetă sunt extrem de dependente de compoziția în aminoacizi.

O proprietate deosebită a acestor polipeptide este temperatura de tranziție T_1 . Temperatura T_1 a polipeptidelor pe bază de (Val.Pro.Gly.Xaa.Gly)_n va fi determinată de aminoacidul din poziția Xaa și rezultată în dependență cu temperatura, pH-ul, potențialul electrochimic etc.

Astfel, de exemplu, mai mulți aminoacizi hidrofobi (Trp) duc la o T_1 mai coborâtă decât la mai mulți aminoacizi hidrofilii (Glu) [124].

Pentru prepararea materialelor cu potențial de aplicare sunt favorabili polimerii cu masă moleculară mare și sistemele care pot face legături transversale. Urry și colaboratorii au preparat diferite elastine cu polipeptide, prin polimerizarea elastinpentapeptidelor pe cale de sinteză și apoi prin sistemul de recombinare. Aceste elastine includ (Val–Pro–Gly–Val–Gly)_n, (Gly–Val–Gly–Val–Pro)₂₅₀, (Gly–Val–Gly–Ile–Pro)₂₆₀, care s-au coacervat și, după aceea, s-au reticulat prin iradiere γ [80, 125, 126].

Elastina cu polimeri s-ar putea produce în cantități mari. Mai multe materiale bioelastice au fost testate pe animale pentru refacerea țesutului moale, de exemplu, ca materiale interpușe la refacerea discului intervertebral la iepure [127].

Alte aplicații potențiale sunt: material de umplere pentru incontinență urinară, reconstrucția vezicii urinare, împiedicarea țesuturilor aderente postoperatorii [128].

Grupul Tamburro a preparat bloc polimeri, folosind regiunile cu elastină mai bogate în glicină (Xaa–Gly–Gly–Yaa–Gly)_n prin sinteză chimică în soluție, unde Xaa și Yaa sunt Val/Leu, Leu/Val, Lys/Val și Orn/Orn. Numai Lys–Gly–Gly–Val–Gly)_n și (Orn–Gly–Gly–Orn–Gly)_n ambii polimeri dispersi, până la 14 kDa, sunt reticulați cu glutaraldehidă și/sau succinimidilester al acidului glutaric sunt corespunzători pentru obținerea de biomateriale [129].

13.9.2.4. HIBRIZI AI ELASTINEI CU ALTE MOLECULE

I. Elastina cu polipeptide de fibronectină.

Fibronectina este o glicoproteină cu masă moleculară ridicată și conține aproximativ 5% carbohidrat. Se leagă de membrana celulară printr-un recep-

tor proteic, dar și de matricea extracelulară, prin componente asemenea collagenului, fibrinei și sulfatului de heparan. Fibronectina se găsește în plasma sanguină în formă solubilă și este compusă din două lanțuri polipeptidice similare (250 kDa), legate între ele prin legături disulfidice. În formă insolubilă, fibronectina este un complex compus din subunități reticulate. Cele două lanțuri polipeptidice ale fibronectinei sunt compuse din aproximativ 30 de module, și sunt pliate, în serii liniare de 5–6 unități funcționale. Aceste unități funcționale au posibilitatea de a interacționa cu componente extracelulare sau cu molecule de la suprafața celulelor. Astfel, domeniul CS₅ al fibronectinei este important pentru contribuția sa la legarea și difuzarea celulelor epiteliale [130].

Proteinele artificiale care constau din elastină-peptide amestecate cu domeniul CS₅ și purificate, arată a fi elastice și contribuie la adeziunea celulelor endoteliale vascular ombilicale umane [131].

Caracteristicile acestor elastin-fibronectin polipeptide pot fi controlate pe baza secvenței aminoacizilor, lungimea diferitelor blocuri și gradul de reticulare [22].

II. Mătase-polimeri de elastină.

Mătasea de păianjen (spidroina) constă, în mare măsură, din glicină și alanină care se repetă și manifestă rezistență mare la tracțiune în combinație cu o elasticitate ridicată [132]. Recent, s-a preparat produsul mătase de păianjen-elastină care s-a dovedit a fi citocompatibil pentru condrocitele umane [87].

Firele de viermi de mătase (fibroina) sunt compuse, mai ales, din glicină, alanină și serină. Moleculele de fibroină conțin regiuni amorfe și regiuni cristaline în raport de aproximativ 2:1.

Cappello și colaboratorii [86] au sintetizat polimeri compuși din fibroină cu blocuri de (Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser) și elastină cu blocuri de Gly-Val-Gly-Val-Pro). Compoziția blocurilor și mărimea polimerilor sunt de importanță majoră pentru proprietățile mecanice, biodegradabilitatea (care are loc în primul rând prin hidroliză enzimatică) și proprietățile fiziologice ale

acestor proteine.

Între posibilitățile de aplicare se numără și sistemele de eliberare controlată a medicamentelor [133] și a genelor [134, 135]. Spre deosebire de alte materiale hibride, compozitele mătase-elastină au fost studiate *in vivo* [136, 137].

13.10. APLICAȚIILE ELASTINEI LA BIOMATERIALE

Elastina ca biomaterial a fost propusă pentru o mare varietate de aplicații ca: înlocuitori de piele [138], grefe vasculare [139], valve cardiace [140], cartilaje elastice [141] etc.

13.10.1. ÎNLOCUITORI DE PIELE

Înlocuitorii de piele sunt utilizați la tratamentul unor plăgi arse sau cronice.

Fibrele de elastină sunt componente importante ale pielii, dar producția lor este limitată la construcția țesuturilor ingineresti [142]. De exemplu, la înlocuitorul de piele „Apligrag”, gelul de collagen tip I este cultivat cu keratinocite și fibroblaste dermice, puțină elastină sintetizată *in vitro*, neorganizată în fibre [143]. În desfășurare, autogrefele, alogrefele, xenogrefele și dermul deepidermizat conțin întotdeauna fibre de elastină. Unele dintre astfel de materiale conțin membrane de porcine decelularizate, cu aproximativ 70% collagen, 30% elastină insolubilă și mici cantități de glicozaminoglicani [142-145]; eșafodaje de collagen tip I acoperite cu 3% α -elastină [145]; hibrizi de elastină și peptide legate covalent la pansamente de alginat [146] și injectate cu α -elastină [147].

13.10.2. CONSTRUCȚII VASCULARE

Construcțiile vasculare sunt de o mare necesitate, mai ales pentru grefele vasculare de diametre mici, în special pentru procedeele de șuntare de deviație a arterei coronariene. Se pot aplica pe tuburi sintetice straturi de elastină, de preferință ca fragmente de tropoelastină sau elastină-polipeptide, care duc la o reducere a trombogenicității la animalele de experiență [123, 148]. De ase-

menea, într-o măsură mai mare, proprietățile mecanice ar fi similare cu cele ale vaselor naturale [149]. Construcțiile tubulare pot fi preparate din elastină, ca material de bază.

13.10.3. AUTOASAMBLAREA MATERIALELOR

O necesitate deosebită în nanotehnologie este aceea de a produce sisteme cu funcționalități dorite la scară nanometrică.

În ultimii ani, s-au dezvoltat multe strategii biomimetice de sinteză pentru a se obține dispozitive nanometrice, în încercarea mimării componentelor biologice.

Cunoașterea forțelor care guvernează stabilitatea termodinamică și specificitatea autoasamblării a devenit scopul central pentru procesul biomimetic. Peptidele și proteinele sunt combinații potrivite pentru a se obține nanostructuri prin „autoasamblare”, ierarhizate și stabilizate pliat, datorită interacțiilor proteină-proteină [180]. Beneficiul atractiv pentru peptidele autoasamblate vine de la cunoașterea precisă a structurii lor. Informațiile funcționale fac posibilă construcția unor materiale cu ajustarea morfologică dictată de combinațiile construite individual [181].

Autoasamblarea polimerilor analogi elastinei reprezintă un domeniu actual pentru cercetare, care oferă o serie de posibile aplicații în nanotehnologie și nanobiotehnologie. Pentru elastină, autoasamblarea este un proces al mediului său natural, deoarece aceasta se formează din precursorul său solubil în apă, tropoelastina, care se agregă în structuri fibrilare prin reticulări covalente interlanț [182-186].

Polimerii, asemănători elastinei, au aplicații biomedicale deosebite cum ar fi ingineria tisulară și eliberarea controlată a medicamentelor. Polimerii asemenea elastinei au o biocompatibilitate deosebită. În sistemele de eliberare controlată a medicamentelor, acești polimeri, asemenea elastinei, pot fi agregați într-o matrice care conține principiile active și diverse alte substanțe.

Polimerul asemănător elastinei, în ingineria tisulară, acționează ca schelet temporar în perioada de creștere a țesutului endogen.

Procesele de implicare a autoasamblării polimerilor, inclusiv a proteinelor, fac parte din sfera nanotehnologiilor și a biomaterialelor [150]. Autoasamblarea materialelor reprezintă, prin definiție, organizarea spontană a moleculelor în condițiile echilibrului termodinamic, în aranjamente structurale bine definite și stabile, prin numărul interacțiilor necovalente [151].

Elastina este un exemplu de biopolimer care poate să se organizeze prin încălzirea tropoelastinei, a elastinei solubilizate și a elastinei (bio) sintetice coacervate, cauzată de interacția hidrofobică între domeniile hidrofobe din moleculă.

Asamblarea în structurile fibroase este bine cunoscută și a fost observată la tropoelastină, fragmente de tropoelastină și la bloc-polimerii de elastină sintetică [83, 152, 153].

Autoasamblarea este utilă mai ales la prepararea materialelor la nanoscară (mărime, proporție, dimensiune). Pentru polimeri, autoasamblarea structurilor include: nanotuburi, nanofibre, nanostraturi și filme nanoporoase [154]. La elastină, autoasamblarea a fost folosită pentru obținerea diferitelor biomateriale, de exemplu, hidrogeluri [155], straturi, filme [78], nanoparticule [156], rețele izotopice asemenea buretelui [32] și materiale nanoporoase [157].

Puține dintre aceste materiale au fost studiate *in vivo*.

O altă aplicație a elastinei în biomateriale pot fi biocapsulele de elastină, integrate în sisteme de eliberare controlată a medicamentelor, de asemenea, pot servi în cosmetică și farmacie.

13.11. REZILINA ȘI ABDUCTINA

Rezilina și abductina sunt două proteine fibroase elastice, au proprietăți asemănătoare cu ale elastinei, dar au structură diferită.

Ambele devin plastice în prezența apei, la temperatură normală, când materialul se umflă, producându-se dezordonarea lanțurilor polipeptidice.

Abductina se găsește în structura ligamentelor și acționează asupra mușchilor aductori. Funcțiile sale se rezumă la simplu tampon elastic de compresie.

Rezilina se găsește la insecte și la alte artropode unde servește ca rezervă pentru sursa de energie elastică. De exemplu, în mecanismul de zbor al lăcustei, rezilina de la încheietura aripii cu corpul, participă la mișcarea aripii până deschiderea maximă și la readucerea ei în poziția inițială, datorită elasticității mari a rezilinei.

Rezilina uscată este dură, dar poate manifesta o deformare de până la trei ori, față de starea inițială, înainte de rupere. Modulul său de elasticitate este în funcție de raportul de extindere (α), cu aproximație, are valoarea 1,8 Mpa.

Tabelul 13.4.

Compoziția în aminoacizi (%) a abductinei și rezilinei de la unele nevertebrate

Aminoacidul	Abductina			Rezilina
	Moluscă	Scoică	Midie	Lăcustă
Asp	1,7	23,9	3,9	10,8
Thr	1,1	1,6	1,4	3,0
Ser	6,0	1,9	8,9	8,1
Glu	1,3	3,4	3,7	4,8
Pro	1,1	7,2	4,7	7,9
Gly	68,4	29,5	41,1	36,7
Ala	3,0	4,6	4,2	10,6
Val	0,5	3,0	2,2	3,2
Met	6,0	13,5	9,7	—
Cys 1/2	0,2	1,5	1,3	—
Ile	0,6	0,8	3,1	1,7
Leu	0,2	3,5	7,2	2,4
Try	0,1	—	0,4	3,1
Phe	8,6	2,6	2,2	2,4
Lys	0,9	2,0	3,4	—
Arg	0,4	0,6	2,2	—
His	—	0,6	2,2	—

Compoziția în aminoacizi a rezilinei și abductinei prezentată în tabelul

13.4. [171] arată că dominanți sunt aminoacizii care nu au resturi laterale capabile de a forma legături între lanțurile polipeptidice, iar lanțurile proteice a acestor două materiale au o conformație neregulată.

Rezilina și abductina acționează ca rezervă de energie mecanică. Ambele proteine sunt capabile de a reveni complet la forma inițială după aplicarea unei deformării, ceea ce presupune existența unor legături transversale probabil datorită tirozinei. Rezilina are o mare rezistență mecanică care reprezintă 96–97% din rezistența unui cauciuc sintetic de bună calitate.

Bibliografie

1. Nenițescu C.D., *Chimie organică*, vol. I și II, Editura Didactică și Pedagogică, București, 1980.
2. Lehninger A.L., *Biochimie*, vol. I și II, Editura Tehnică, București, 1987, 1992.
3. Cox B.A., Starcher B.C., Urry D.W., *J. Biol. Chem.*, 249, 997, 1974.
4. Wu W.J., Vrhovski B., Weiss A.S., *J. Biol. Chem.*, 274, 21719-21724, 1999.
5. Daamen W.F., Veerkamp J.H., van Hest J.C.M., van Kuppevelt T.A., *Biomaterials*, vol. 28, 4378-4398, 2007.
6. Powell J.T., Vine N., Crossman M., *Atherosclerosis*, 97, 201-208, 1992.
7. Pasquali-Ronchetti M., Baccarani-Contri, *Microsc. Res. Tech.*, 38, 428-435, 1997.
8. Martyn C.N., Greenwald S.E., *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 28, 948-951, 2001.
9. Ayad S., Boot-Handford R.P., Humphries M.J., Kadler K.E., Shuttleworth C.A., *The Extracellular matrix facts book*, Academic Press, London, GB, 1994.
10. Chrzanowski P., Keller S., Cerreta J., Mandl I., Turino G.M., *Am. J. Med.* 69, 351-359, 1980.
11. Rosenbloom J., Abrams W.R., Mecham R.P., *FASEB J.*, 1208-1218, 1993.
12. Elden H., *Biophysical Properties of the Skin*, Wiley-Inter-Science, a Division of John Wiley & Sons, Inc. New York, London, Sydney, Toronto, 1971.
13. Keech M.K., *Ann. Rheum. Diseases*, 17, 23, 1958.

14. Carton R.W., Dainauskas J., Tews B., Hass G.M., *Amer. Rev. Respirat. Diseases*, 82, 186, 1960.
15. Chiriță Gh., Chiriță M., *Pielea animală*, Editura Tehnică, București, 1993.
16. Ramirez F., Pereira L., *J. Biochem. Cell. Biol.*, 31, 255-259, 1999.
17. Mithieux S.M., Weiss A.S., *Adv. Protein Chem.*, 70, 437-461, 2005.
18. Hinek A., Rabinovitch M., *J. Cell. Biol.*, 126, 563-574, 1994.
19. Robert L., *Connect. Tissue Res.*, 40, 75-82, 1999.
20. Mecham R.P., Hinek A., Entwistle R., Wrenn D.S., Griffin G.L., Senior R.M., *Biochemistry*, 28, 3716-3722, 1989.
21. Hinek A., Wrenn D.S., Mecham R.P., Barondes S.H., *Science*, 239, 1539-1541, 1988.
22. Bisaccia F., Castiglione-Morelli M.A., Spisani S., Ostuni A., Serafini-Fracassini A., Bavoso A., *Biochemistry*, 37, 11128-11135, 1998.
23. Klevay L.M., *J. Nutr.*, 130, 4898-4928, 2000.
24. Kielty C.M., Sherratt M.J., Shuttleworth C.V.A., *J. Cell. Sci.*, 2002, 115, 2817-2828.
25. Kozel B.A., Ciliberto C.H., Mecham R.P., *Matrix Biol.*, 23, 23-34, 2004.
26. Indik Z., Yeh H., Ornstein-Goldstein N., Sheppard P., Anderson N., Rosenbloom J.C., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 84, 5680-5684, 1987.
27. Zeh H., Ornstein-Goldstein N., Indik Z., Sheppard P., Anderson N., Rosenbloom J.C., *Collagen Rel. Res.*, 7, 235-247, 1987.
28. Debelle L., Alix A.J., *Biochimie*, 81, 981-994, 1999.
29. Hsiao H., Stone P.J., Toselli P., Rosenbloom J.C., Franzblau C., Schreiber B.M., *Connect. Tissue Res.*, 40, 83-95, 1999.
30. Jones P.A., Scott-Burden T., Gevers W., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 353-357, 1979.
31. Long J.L., Tranquillo R.T., *Matrix Biol.*, 22, 339-350, 2003.
32. Bellingham C.V.M., Lillie M.A., Gosline J.M., Wright G.M., Stracher B.C., Bailey A.J., *Biopolymers*, 70, 445-455, 2003.
33. Zarkadas C.G., Zarkadas G.C., Karatzas C.N., Khalili A.D., Nguyen Q., *J. Chromatogr.* 378, 67-76, 1986.
34. Yamaguchi Y., Haginaka J., Kunitomo M., Zasuda H., Bando Y., *J. Chromatogr.*, 422, 53-59, 1987.
35. Suyama K., Nakamura F., *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 170, 713-718, 1990.
36. Brown-Augsburger P., Tisdale C., Broekelmann T., Sloan C., Mecham R.P., *J. Biol. Chem.*, 270, 17778-17783, 1995.

37. Umeda N., Takeuchi M., Suyama K., *J. Biol. Chem.*, 276, 12779-12587, 2001.
38. Popescu A., Cristea E., Zamfirescu-Gheorghiu M., *Biochimie*, Editura medicală, București, 1980.
39. La Bella F.S., Kellerg F.S., Thornhill D., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 26, 748, 1967.
40. Miller R.L., Pinnel S.R., Martin G.R., Schiffman E., *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 26, 132, 1967.
41. Partridge S.M., *Nature*, 209, 399, 1966.
42. Partridge S.M., *Biochem. Biophys. Acta*, 140, 132, 1967.
43. Partridge S.M., *Nature*, 213, 1123, 1976.
44. Piez K.A., Sherman M.R., *Biochemistry*, 9, 4129, 1970.
45. Urry D.W., Parker T.M., *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 23, 543-559, 2002.
46. Li B., Daggett V., *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, 561-573, 2002.
47. Gosline J.M., Lillie M.A., Carrington E., Guerette P., Ortlepp C., Savage K., *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 357, 121-132, 2002.
48. Vrhovski B., Weiss A.S., *Eur. J. Biochem.* 258, 1-18, 1998.
49. Urry D.W., Hugel T., Seitz M., Gaub H.E., Sheiba L., Dea J., *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 357, 169-184, 2002.
50. Kakivaya S.R., Hoeve C.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 3505- 3507, 1975.
51. Lillie M.A., Gosline J.M., *Biopolymers*, 29, 1147-1160, 1990.
52. Samouillan V., Andre C., *Biomacromolecules*, 5, 958-964, 2004.
53. Urry D.W., *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, 205-212, 1976.
54. Keeley F.W., Bellinham C.M., Woodhouse K.A., *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 357, 185-189, 2002.
55. Mecham R.P., Lange G., *Biochemistry*, 21, 669-673, 1982.
56. Vrhovski B., Jensen S., Weiss A.S., *Eur. J. Biochem.*, 250, 92-98, 1997.
57. Van Hest J.C., Tirrell D.A., *Chem. Common (Camb.)*, 1897-1904, 2001.
58. Bressan G.M., Pasquali-Ronchetti I., Fornieri C., Mattioli F., Castellani I., Volpin D., *J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.*, 94, 209-216, 1986.
59. Clarke A.W., Arnsperg E.C., Mithieux S.M., Korkmaz E., Braet F., Weiss A.S., *Biochemistry*, 45, 9989-9996, 2006.
60. Hoeve A.J., Flory P.J., *J. Amer. Chem. Soc.*, 80, 6523, 1958.
61. Hinds M.T., Courtman D.W., Goodell T., Kwong M., Brant-Yawadski H., Burke A., *J. Biomed. Mater. Res.*, 69 A, 55-64, 2004.
62. Barder A., Schilling T., Teebken O.E., Brandes G., Herden T., *Eur. J. Cardiothorac. Surg.*, 14, 279-284, 1998.

63. Brown A.L., Farhat W., Merguerian P.A., Wilson G.J., Khoury A.E., Woodhouse K.A., *Biomaterials*, 23, 2179-2190, 2002.
64. Lansing A.I., Rosenthal T.B., Alex M., Dempsey W., *Anat Rec.*, 114, 555-575, 1952.
65. John R., Thomas J., *Biochem J.*, 127, 261-269, 1972.
66. Starcher B.C., Galione M.J., *Anal. Biochem.*, 74, 4417-4447, 1976.
67. Daamen W.F., Hofmans T., Veerkamp J.H., van Kuppevelt T.H., *Tissue Eng.*, 11, 1168-1176, 2005.
68. Sandberg L.B., Wolt T.B., *Methods Enzymol.*, 82 (PtA), 657-665, 1982.
69. Rucker R.B., *Methods Enzymol.*, 82 (PtA), 650-657, 1982.
70. Partridge S.M., Davis H.F., Adair G.S., *Biochem. J.*, 61, 11-21, 1955.
71. Heilshorn S.C., Liu J.C., Tirrell D.A., *Biomacromolecules*, 6, 318-323, 2005.
72. Jacob M.P., Hornebeck W., In: Robert L., Moczar M., editors. *Methods of connective tissue research*, vol. IV, Basel: Karger, 92-129, 1985.
73. Hattori M., Yamaji-Tsukamoto K., Kumagai H., Feng Y., Takahasski K., *J. Agric. Food Chem.*, 46, 2167-2170, 1998.
74. Wei S.M., Katona E., Facht J., Fülöp T., Robert L., Jacob M.P., *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 115, 33-41, 1998.
75. Indik Z., Abrams W.R., Kucick U., Gibson C.W., Mecham R.P., Rosenbloom J., *Arch. Biochem. Biophys.*, 280, 80-86, 1990.
76. Martin S.L., Vrhovski B., Weiss A.S., *Gene*, 154, 159-166, 1995.
77. Stone R.J., Morris S.M., Griffin S., Mithieux S.M., Weiss A.S., *Am. J. Respir. Cell.Mol. Biol.*, 24, 733-739, 2001.
78. Mithieux S.M., Rasko J.E., Weiss A.S., *Biomaterials*, 25, 4921-4927, 2004.
79. Bellingham C.M., Woodhouse K.A., Robson P., Rothstein S.J., Keeley F.W., *Biochem. Biophys. Acta*, 1550, 6-19, 2001.
80. Lee J., Macosko C.W., Urry D.W., *Biomacromolecules*, 2, 170-179, 2001.
81. Martino M., Tamburro A.M., *Biopolymers*, 59, 239-37, 2001.
82. McMillan R.A., Lee T.A.T., Conticello V.P., *Macromolecules*, 32, 3643-3648, 1999.
83. Nagapudi K., Brinkman W.T., Thomas B.S., Park J.O., Srinivasarao M., Wright E., *Biomaterials*, 26, 4695-4706, 2005.
84. Arias F.J., Reboto V., Martin S., Lopez I., Rodriguez-Cabello J.C., *Biotechnol. Lett.*, 28, 687-695, 2006.
85. Welsh E.R., Tirrell D.A., *Biomacromolecules*, 1, 23-30, 2000.

86. Cappello J., Crissman J., Dorman M., Mikolajczak M., Textor G., Marquet M., *Biotechnol. Prog.*, 6, 198-202, 1990.
87. Sheller J., Henggeler A., Viviani A., Conrad U., *Transgenic. Res.*, 13, 51-57, 2004.
88. Ayres L., Koch K., Adams H.H.M., van Hest J.C.M., *Macromolecules*, 38, 1699-1704, 2005.
89. Gobin A.S., West J.L., *J. Biomed. Mater. Res.*, 67 A, 255-259, 2003.
90. Silacci P., Stergiopoulos N., *S. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2005.
91. Bader A., Schilling T., Teebken O.E., *Eur. J. Cardiothorac. Surg.*, 14, 3, 279-284, 1998.
92. Schmidt C.E., Bayer J.M., *Biomaterials*, 21, 22, 2215-2231, 2000.
93. Daamen W.F., Hofmans J.H., van Hest J.C.M., van Kuppervelt T.H., *Biomaterials*, vol. 22., 14, 1997-2005, 2001.
94. Debelle L., Tamburro A.M., *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 31, 261-272, 1999.
95. Fauvel-Lafeve F., *Int. Rev. Cytol.*, 188, 1-40, 1999.
96. Chalain Tde., Phillips J. H., Hinek A., *J. Biomed. Mater. Res.*, 244, 280-288, 1999.
97. Samoullan V., Dandurand-Lads J., Lamure A., Maurel E., Lacabanne C., Gerosa G., Venturini A., Casarotto D., Gerardini L., Spina M., *J. Biomed. Mater. Res.*, 46, 531-538, 1999.
98. Lamme E.N., De Vries J.C., van Veen H., Gabbiani G., Westerhof W., Middelkoop E., *J. Histochem. Cytochem.*, 44, 1311-1322, 1996.
99. Starcher B.C., Gabone M.J., *Anal. Biochem.*, 74, 4417-4447, 1976.
100. Soskel N.T., Sandburg L.B., *Exp. Lung Res.*, 4, 109-119, 1983.
101. Lansing A.I., Rosenthal T.B., Alex M., Demsey W., *Anat. Rec.*, 114, 555-575, 1952.
102. Rasmusen B.L., Bruenger E., Sandberg L.B., *Anal. Biochem.* 64, 255-259, 1975.
103. John R., Thomas J., *Biochem J.*, 127, 261-269, 1972.
104. Paz M.A., Keith D.A., Traverso H.P., Gallop P.M., *Biochemistry*, 15, 4912-4918, 1976.
105. Ritz-Timme S., Laumeier L., Collins M.J., *Br. J. Dermatol.*, 149, 951-959, 2003.
106. Uitto J., *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 15, 303-304, 2001.
107. Hattori M., Takahaski K., *Food Hydrocolloid.*, 7, 327-335, 1993.
108. Leach J.B., Wolinsky J.B., Stone P.J., Wong J.Y., *Acta Biomater.*, 1, 115-124, 2005.

109. Duca N., Floquet N., Alex A.J., Haye B., Debelle I., *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 49, 235-244, 2004.
110. Rabaud M., Lefebvre F., Ducasson D., *Biomaterials*, 12, 313-319, 1991.
111. Lefebvre F., Gorecki S., Bareille R., Amedee J., Bordenave L., Rabaud M., *Biomaterials*, 13, 28-33, 1992.
112. Lefebvre F., Pilet P., Bonzon N., Daculsi G., Rabaud M., *Biomaterials*, 17, 1813-1818, 1996.
113. Rovira A., Amedee J., Bareille R., Rabaud M., *Biomaterials*, 17, 1535-1540, 1996.
114. Barbie C., Angibaud C., Darnis T., Lefebvre F., Rabaud M., Aprahamian M., *Biomaterials*, 10, 445-448, 1989.
115. Bonton N., Carrat X., Deminière C., Daculsi G., Lefebvre F., Rabaud M., *Biomaterials*, 16, 881-885, 1995.
116. San-Galli F., Deminière C., Guérin J., Rabaud M., *Biomaterials*, 17, 1081-1085, 1996.
117. Dutoya S., Verna A., Lefebvre F., Rabaud M., *Biomaterials*, 21, 1521-1529, 2000.
118. Urry D.W., Pattanaik A., Xu J., Woods T.C., McPherson D.T., Parker T.M., *J. Biomater. Sci. Polymers Edn.*, 9, 1015-1048, 1998.
119. McGrath K.P., Tirrell D.A., Kawai M., Mason T.L., Fournier M.J., *Biotechnol. Prog.*, 6, 188-192, 1990.
120. Chilkoti A., Christensen T., Mackay J.A., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 10, 652-657, 2006.
121. Bedell-Hogan D., Trackman P., Abrams W., Rosenbloom J., Kagan H., *J. Biol. Chem.*, 268, 10345-10350, 1993.
122. Ostuni A., Lograno M.D., Gasbarro A.R., Bisaccio F., Tamburro A.M., *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 34, 130-135, 2002.
123. Woodhouse K.A., Klement P., Chen V., Gorbet M.B., Keeley F.W., Stahl R., *Biomaterials*, 25, 4543-4553, 2004.
124. Urry D.W., *J. Phys. Chem. B*, 101, 11007-11028, 1997.
125. Lee J., Macosko C.W., Urry D.W., *Macromolecules*, 34, 5968-5974, 2000.
126. Wood S.A., Lemons J.E., Prasod K.V., Urry D.W., *J. Biomed. Mater. Res.*, 20, 315-335, 1986.
127. Alkalay R.N., Kim D.h., Urry D.W., Xu J., Parkre T.M., Glazer P.A., *Spine*, 28, 1659-1665, 2003.
128. Urry D.W., *Trends Biotechnol.*, 17, 249-257, 1999.
129. Martino M., Perri T., Tamburro A.M., *Macromol. Biosci.*, 2, 319-328, 2002.

130. Massia S.P., Hubbel J.A., *J. Biol. Chem.*, 267, 14019-14026, 1992.
131. Heilshorn S.C., Dizio K.A., Welsh E.R., Tirrell D.A., *Biomaterials*, 24, 4245-4252, 2003.
132. Scheller J., Gubrs K.H., Conrad U., *Nat. Biotechnol.*, 19, 573-577, 2001.
133. Cappello J., Crissman J.W., Crissman M., Ferrari F.A., Textor G., Wallis O., *J. Control Release*, 53, 105-117, 1998.
134. Megeed Z., Haider M., Li D., O'Malley B.W., Cappello J., Ghandehari H., *J. Control Release*, 94, 433-445, 2004.
135. Haider M., Leung V., Ferrari F., Crissman J.M., Powell J., *Mol. Pharm.*, 2, 139-150, 2005.
136. Megeed Z., Cappello J.M., Ghandehari H., *Adv. Drug Deliv. Res.*, 54, 1075-1091, 2002.
137. Haider M., Megeed Z., Ghandehari H., *J. Control Release*, 1-26, 2004.
138. Lamme E.N., van Leenwen R.T., Jonker A., van Morle J., Middelkoop E., *J. Invest. Dermatol.*, 111, 989-995, 1998.
139. Boland E.D., Mathews J.A., Pawlowski K.J., Simpson D.G., Wnek G.E., Bowlin G.L., *Front Biosci.*, 9, 1422-1432, 2004.
140. Neuenschwander S., Hoerstrup S.P., *Transpl. Immunol.*, 12, 359-365, 2004.
141. Xu J.W., Johnson T.S., Motarjem P.M., Peretti G.M., Randolph M.A., Zaremchuk M.J., *Plast. Reconstr. Surg.*, 115, 1633-1641, 2005.
142. Truong A.T., Kowal-Vern A., Latenser B.A., Wiley D.E., Walter R.J., *J. Burns Wounds*, 4, 4, 2005.
143. Casasco M., Casasco A., Icaro C.A., Farina A., Calligaro A., *J. Mol. Histol.*, 35, 421-428, 2004.
144. Jones I., Currie L., Martin R., *Br. J. Plast. Surg.*, 55, 185-193, 2002.
145. De Vries H.J., Zeegelaar J.E., Middelkoop E., Gijsbers G., van Marle J., Wildevuur C.H., *Br. J. Dermatol.*, 132, 690-697, 1995.
146. Hashimoto T., Suzuki Y., Tanihara M., Kakimara Y., Suzuki K., *Biomaterials*, 25, 1407-1414, 2004.
147. Hinek A., Wang Y., Liu K., Mitts T.F., Jimenez F., *J. Dermatol. Sci.*, 39, 155-166, 2005.
148. Jordan S.W., Haller C.A., Sallach R.E., Apkarian R.P., Hanson S.R., Chaikof E.L., *Biomaterials*, 28, 1191-1197, 2007.
149. Mitchell S.L., Niklason L.E., *Cardiovasc. Pathol.*, 12, p. 59-64, 2003.
150. Zhang S., *Biotechnol. Adv.*, 20, 321-339, 2002.
151. Whitesides G.M., Mathias J.P., Seto C.T., *Science*, 254, 1312-1319, 1991.

152. Huang L., McMillan R.A., Apkarian R.P., Pourdeyhi B., Conticello V.P., Chaikop E.L., *Macromolecules*, 33, 2989-2997, 2000.
153. Nagapudi K., Brinkman W.T., Leisen J.E., Huang L., McMillan R.A., Apkarian R.P., *Macromolecules*, 35, 1730-1737, 2002.
154. Zhang S., *Nat. Biotechnol.*, 21, 1171-1178, 2003.
155. Wright E.R., McMillan R.A., Cooper A., Apkarian R.P., Conticello V.P., *Adv. Funct. Mater.*, 12, 149-154, 2002.
156. Herrero-Vanrell R., Rincon A.C., Alonso M., Reboto V., Molina-Martinez I.T., Rodriguez-Cabello J.C., *J. Control Release*, 102, 113-122, 2005.
157. Reguera J., Fahmi A., Mariarty P., Girotti A., Rodriguez-Cabello J.C., *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 13212-13213, 2004.
158. Bailey A., *Biochem. Biophys. Acta*, 160, 447-453, 1968.
159. Robins S.P., *Methods Biochem. Anal.*, 28, 329-339, 1982.
160. Partridge S.M., Elsdon D.F., Thomas J., Dortman A., Telser A., Ho P.L., *Biochem. J.*, 93, 30c-33c, 1964.
161. Miller E.J., Martin G.R., Mecca C.E., Piez K.A., *J. Biol. Chem.*, 240, 3623-3627, 1965.
162. Cames W.H., *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, 30, 995-1000, 1971.
163. Harris E.D., O'Dell B.L., *Adv. Exp. Med. Biol.*, 48, 267-284, 1974.
164. Murray J.C., Levene C.I., *Biochem. J.*, 167, 463-467, 1977.
165. Murray J.C., Fraser D.R., Levene C.I., *Exp. Mol.*, 1978.
166. Bird T.A., Levene C.I., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 108, 1172-1182, 1982.
167. Bird T.A., Levene C.I., *Biochem. J.*, 210, 633-638, 1983.
168. Levene C.I., Carrington M.J., *Biochem. J.*, 232, 293-296, 1985.
169. Levene C.I., *J. Exp. Med.*, 113, 795-810, 1961.
170. Levene C.I., *J. Exp. Med.*, 114, 295-310, 1961.
171. Vincent J.F.V., *Structural Biomaterials*, Princeton University Press, Princeton, New Jersey, 1991.
172. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watters P., *Molecular Biology of the Cell*, 4th edn, New York, Garland Science, 2002.
173. Garret R.H., Grisham C.M., *Biochemistry*, Pacific Grove, CA, Brook/Cole Thomas Learning, 2002.
174. Sandberg L.B., Leslie J.G., Leach C.T., Torres V.L., Smith A.R., Smith D.W., *Elastin covalent structure as determined by solid-phase amino-acid-sequencing*, *Pathol. Biol.* 33, 266-274, 1985.

175. Yeh H., Ornstein-Goldstein N., Indik Z., Sheppard P., Anderson N., Rosenbloom J.C., Cicilia G.C., Yoon K., Rosenbloom J., *Sequence variation of bovine elastin mRNA due to alternative splicing*, *Collagen Rel. Res.*, 7, (4), 235-247, 1987.
176. Sandberg L.B., Soskel N.T., Leslie J.G., *Elastin structure, biosynthesis and relation to disease states*, *New Engl. J. Med.*, 304, 566-579, 1981.
177. Indik Z., Yeh H., Ornstein-Goldstein N., Sheppard P., Anderson N., Peltonen L., Rosenbloom J.C., Rosenbloom J., *Alternative splicing of human elastin mRNA indicated by sequence analysis of cloned genomic and complementary DNA*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84, 5680-5684, 1987.
178. Di Zio K., Tirrell D.A., *Mechanical properties of artificial protein matrices engineered for control of cell and tissue behavior*, *Macromolecules*, 36, 1553-1558, 2003.
179. Martino M., Perri T., Tamburro A.M., *Biopolymers and biomaterials based on elastomeric proteins*, *Macromol. Biosci.*, 2, 319-328, 2002.
180. Rajagopal K., Schneider J.P., *Self-assembling peptides and proteins for nanotechnological application*, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 14, 480-486, 2004.
181. Rodriguez-Cabello J.C., Prieto S., Reguera J., Arias F.J., Ribeiro A., *Biofunctional design of elastin-like polymers for advanced application in nanotechnology*, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.*, 18 (3), 269-286, 2007.
182. Miao M., Cirulis J.T., Lee S., Keeley F.W., *Structural Determinants of Cross-linking and Hydrophobic Domains for Self-Assembly of Elastin-like Polypeptides*, *Biochemistry*, 44, 14367-14375, 2005.
183. Yang G.C., Woodhouse K.A., Yip C.M., *Substrate-Facilitated Assembly of Elastin-Like Peptides: Studies by Variable-Temperature in Situ Atomic Force Microscopy*, *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 10648-10649, 2002.
184. Wright E.R., Conticello V.P., *Self-assembly of block copolymers derived from elastin - mimetic polypeptide sequences*, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54, 1057-1073, 2002.
185. Lee T.A.T., Cooper A., Apkarian R.P., Conticello V.P., *Thermo-reversible self-assembly of nanoparticles derived from elastin-mimetic Polypeptides*, *Adv. Mater.*, 12, p. 1105-1110, 2000.
186. Reguera J., Fahmi A., Moriarty P., Girotti A., Rodriguez-Cabello J.C., *Nanopore formation by self-assembly of the model genetically*

- engineered elastin-like polymer* [(VPGVG)₂(VPGEV)(VPGVG)₂]₁₅, J.Am.Chem. Soc., 126, 13212-13213, 2004.
- 187.L.Robert, *Elastin and elastic fibers, aging and pathology*, Med.& Longevity, 1,, 2, 61-63, 2009.
- 188.Behnaz Aghaei-Ghareh-Bolagh et al., *Elastic proteins and elastomeric protein alloys*, Current Opinion in Biotechnology, 39, 56-60, 2016.
- 189.Mecham P.R., *Elastin in lung development and disease pathogenesis*, Matrix Biology, 11, 2018.
- 190.Xunjie Yu, Yunjie Wang, Yanhang Zhang, *Transmural variation in elastin fiber orientation distribution in the arterial wall*, J.Mech. Behavior of Biomedical Materials, 77, 745-753, 2018.
- 191.Halabi M.C., Mecham P.R., *Elastin purification and solubilization*, Methods in Cell Biology, 143, 207-222, 2018.
- 192.Stoilov I. et al, *Measurement of elastin, collagen, and total protein levels in tissues*, Meth. In Cell biology, 143, 133-146, 2018.
- 193.Sanathana Konugolu Venkata Sekar et al, *Broadband diffuse optical characterization of elastin for biomedical applications*, Biophysical Chemistry, 229, 130-134, 2017.
- 194.Rnjak-Kovacina J. et al, *Elastin Biopolymers*, Comprehensive Biomaterials II, 2, 412-437, 2017.
- 195.Roberts S., Costa S. et al, *Elastin-like Polypeptides*, Comprehensive Biomaterials II, 2, 90-108, 2017.
- 196.Kristensen J.H., Karsdal M.A., *Elastin*, Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin, 197-201, 2016.
- 197.Angela C., Huertas M. et al, *Molecular-level insights into aging processes of skin elastin*, Biochimie, 128-129, 163-173, 2016.
- 198.Cabello J.C.R. et al, *Elastin-like materials for tissue regeneration and repair*, Peptides and Proteins as Biomaterials for Tissue Regeneration and Repair, 309-327, 2018.

CAPITOLUL 14

KERATINA

14.1.	Introducere	1174
14.2.	Epidermul	1176
14.3.	Părul	1180
14.3.1.	Constituția firului de păr	1181
14.3.1.1.	Măduva	1182
14.3.1.2.	Scoarța sau stratul cortical	1182
14.3.1.3.	Cuticula	1185
14.3.1.4.	Foliculul pilos	1186
14.3.1.5.	Mușchiul erector	1188
14.3.1.6.	Forma și culoarea părului	1188
14.4.	Keratinizarea	1192
14.5.	Structura chimică a keratinelor, compoziția în aminoacizi din fibre și componenții lor morfologici	1198
14.6.	Stadiile de organizare ale keratinelor din păr	1200
14.6.1.	Structura α-keratinei	1203
14.6.2.	Structura β-keratinei	1206
14.6.3.	Structura γ-keratinei	1207
14.7.	Proprietățile fizico-chimice ale keratinelor	1208
14.7.1.	Acțiunea acizilor și bazelor asupra keratinelor	1208
14.7.2.	Reducerea și oxidarea keratinelor	1210
14.8.	Solubilizarea și reconstituirea keratinelor	1212
14.9.	Pana	1216
	Bibliografie	1222

14.1. INTRODUCERE

Keratinele sunt cu câteva sute de mii de ani mai tinere decât collagenul. Formarea lor este, de fapt, consecința necesității unei părți din vertebrate de a trece de la viața acvatică la cea terestră și, deci, necesitatea de a-și prevedea o îmbrăcăminte externă care să prevină pierderea umidității din organism.

Keratinele sunt proteine fibroase care se formează în tegumentele animalelor printr-un proces biochimic continuu, numit keratinizare sau cornificare și se găsesc în epidermul, părul, unghiile și copitele mamiferelor, penele, unghiile și ciocul păsărilor, ghiarele și cuirasa reptilelor.

Artropodele, cum sunt crustaceele, frecvent au o parte din exoschelet alcătuit din keratină, uneori în combinație cu chitina. Maxilarul superior al balenei are niște lame keratinoase care filtrează apa din gură, reținând astfel hrana.

Keratinele se găsesc, de asemenea, în tractul gastrointestinal a unui număr mare de animale.

La mamifere, se regăsesc keratine epiteliale moi (*citokeratinele*) și keratine tari (*exokeratinele*).

Mătăsurile produse de insecte sau păianjeni, adesea, sunt clasificate ca keratine, cu toate că nu este clar dacă sunt legate filogenetic de keratinele vertebratelor.

Sunt două forme principale de keratine: α -keratina care se găsește la mamifere și la om [50, 51] și β -keratina, la reptile și păsări.

La mamifere, în cadrul α -keratinelor, se disting două familii de keratine: *keratinele epiteliale* sau *citokeratinele* și keratinele din structura părului și unghiilor numite *exokeratine*. Citokeratinele se pot diviza, la rândul lor, în *citokeratine* de tip I (acide, $\text{pH} < 7$) și *citokeratine* de tip II (bazice sau neutre, $\text{pH} \geq 7$). Grupa exokeratinele, de asemenea, se divizează în *exokeratine* de tip I (acide, $\text{pH} < 7$) și *exokeratine* de tip II (bazice sau neutre, $\text{pH} \geq 7$).

Citokeratinele de tip I sunt asociate cu citokeratinele de tip II, pentru a forma filamentele intermediare.

Între principalele citokeratine de tip I sunt keratinele: K9, K10, K11, K12,

K13, K14, K15, K16, K17, K18, K19, K20, K21.

Între principalele citokeratine de tip II se regăsesc keratinele: K1, K2, K2A, K3, K4, K5, K6, K6A, K7, K8 (K2A și K6A nu sunt prezente la om).

Exokeratinele se găsesc la mamifere în păr și unghii.

Exokeratinele de tip I conțin 11 grupe de keratine: K31, K32, K33A, K33B, K34, K35, K36, K37, K38, K39, K40.

Exokeratinele de tip II constau din 6 keratine: K81, K82, K83, K84, K85, K86.

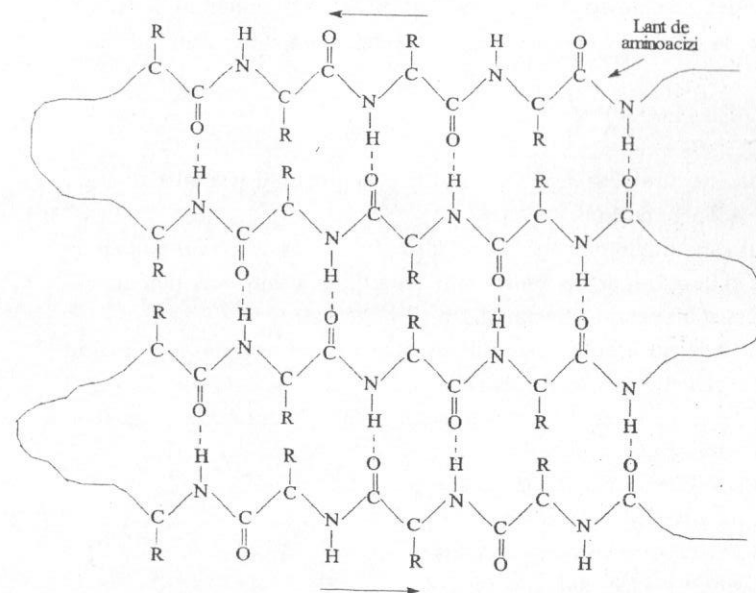


Fig. 14.1. Foaițe β pliate compuse din lanțuri peptidice antiparalele

β -Keratinele. β -Keratina este un enantiomer al α -keratinei. Ea are o structură mai rigidă decât α -keratina. β -Keratina se găsește în carcasa și ghiarele reptilelor, în carapacea broaștelor țestoase de apă dulce și apă sărată,

în penele, ciocul și gherele păsărilor [1, 2, 49].

β -Keratina conține, în structura sa secundară, pe porțiuni ale lanțului polimeric, structuri în formă de foi β pliate.

O foaie β este o sumă a mai multor lanțuri β conectate lateral prin trei sau mai multe legături de hidrogen, formând, în general, straturi pliate răsucite. O foaie β se extinde, în lungime, prin lanțuri de 5–10 aminoacizi.

Un lanț peptidic β se leagă prin legături de hidrogen cu un alt lanț β paralel sau antiparalel. Deci, o foaie β (foaie pliată β) este un ansamblu de lanțuri β legate între ele prin legături de hidrogen (lanțuri paralele sau antiparalele) (Fig.14.1.).

14.2. EPIDERMUL

Epidermul este stratul superficial al pielii și reprezintă țesutul de natură epitelială care acopere dermul.

Epidermul este un epiteliu stratificat, format exclusiv din celule, lipsit de vase sanguine și despărțit de dermul pe care se sprijină, printr-o membrană bazală. Celulele sunt alimentate dinspre derm, prin difuzie.

Epidermul este un produs al ectodermului ca și cornea ochilor, smalțul dinților, rectum și sistemul nervos central.

Epidermul este compus din cinci straturi celulare, suprapuse, care sunt, plecând de la exterior următoarele (Fig. 14.2.):

- *Stratum corneum* (Straturile exfoliator și stratul cornos);
- *Stratum lucidum* (Stratul lucios);
- *Stratum granulosum* (Stratul granulos);
- *Stratum spinosum* (Stratul spinos);
- *Stratum germinativum* (Stratul germinativ sau bazal).

Epidermul poate fi împărțit și în două straturi distincte: unul profund, constituit din celule a căror nucleu se pot colora intens, constituind partea cea mai groasă a epidermului, care prin macerare îndelungată se transformă într-o masă cu aspect mucilaginos, numit *corpul mucos*, care este epidermul propriu-zis și cel de al doilea, mai subțire, transparent și uscat, format din celule cu as-

pect de solzi, lipsite de nucleu, numit *stratul cornos*.

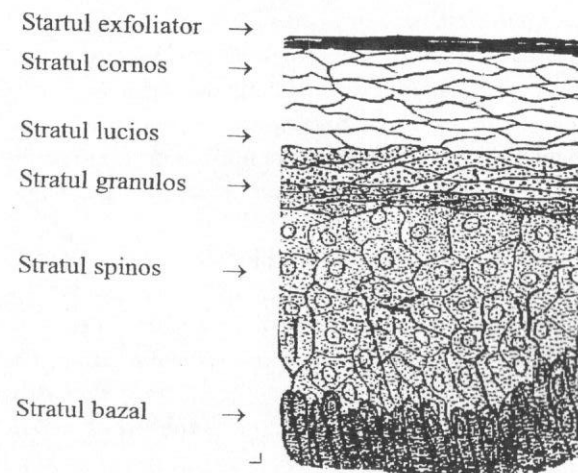


Fig. 14.2. Reprezentarea schematică a structurii histologice a epidermului. Epidermul reprezintă 1–5 % din grosimea pieilor celor mai multe animale.

Celulele tuturor straturilor epidermului sunt într-o permanentă evoluție și într-o continuă deplasare dinspre stratul bazal în spre suprafața epidermului. Deplasarea celulelor este însoțită de o continuă schimbare a compoziției chimice și a unor modificări histologice deosebite. Celulele din stratul bazal ajung în stratul exfoliator, keratinizarea fiind completă și ele capătă aspect de solzi, se desprind și cad (se exfoliază).

Stratul bazal, germinativ sau generator, este cel mai profund strat al epidermului, este stratul keratinocitelor atașate de membrana bazală prin *hemidesmozomi*.

Celulele stratului bazal sunt separate de derm printr-o membrană densă. Membrana celulelor bazale prezintă în partea orientată în spre derm, la intervale regulate, anumite îngroșări. În această arie se înserează filamente (*hemidesmozomii*) care trec în citoplasmă. De-a lungul membranelor plasmactice ale

celulelor bazale adiacente și a interferenței dintre stratul bazal și primul rând de celule din stratul spinos, se formează *desmozomii*.

Stratul bazal sau germinativ este constituit dintr-un singur rând de celule (keratinocite) cilindrice sau cuboidale, aranjate una lângă alta, cu nucleu voluminos, oval sau rotund, reticul endoplasmatic granulos voluminos, aparat Golgi dezvoltat, numeroase mitocondrii. Între aceste celule se găsesc celule neepidermice, Langerhans (provin din măduva osoasă) și celule Merkel (celule ale sistemului neuroendocrinian difuz), dar și melanocite (celule epidermice) care datorită pigmentilor melaninici sunt responsabile pentru culoarea pielii și a bronzajului. Celule Langerhans se găsesc și în stratul spinos.

Celulele epiteliale se multiplică prin diviziune celulară la nivelul stratului bazal, iar celulele noi împing alte celule în sus.

Celulele bazale și cele ale stratului spinos conțin fibrile constituite din filamente cu o grosime de 60–80Å.

Stratul spinos este compus din 6–20 rânduri de celule de formă poliedrică, cu o citoplasmă vâscoasă, mai densă la periferie decât în regiunea nucleului, au un nucleu voluminos, de formă rotundă, așezat central. Celulele din stratul spinos au între ele spații ocupate de o substanță semilichidă, probabil limfă, care servește la hrănirea celulelor.

Spațiile intercelulare sunt prezente și în stratul epidermic următor, *stratul granulos*, acolo unde nu a avut loc încă procesul de keratinizare. Pe măsură ce procesul de keratinizare avansează, spațiile intercelulare dispar, iar celulele keratinizate ale epidermului se prezintă lipite unele de altele. Existența spațiilor intercelulare în straturile nekeratinizate face ca legătura dintre celule să aibă loc prin intermediul *desmozomilor*, punți intercelulare care pornesc radial de la fiecare celulă și se întâlnesc la mijlocul spațiului intercelular. În citoplasmă se găsesc *tonofibrilii*, filamente intermediare, care se grupează în mănunchiuri pentru a forma *tonofibrilii compuși* ai keratinei.

Punțile intercelulare sunt însoțite de fibre foarte fine, care se continuă în interiorul celulelor, le străbat și apar pe partea opusă unde însoțesc punțile intercelulare, spre a se continua în celula următoare și așa mai departe. În felul acesta, întreg țesutul epitelial al epidermului este străbătut de un sistem fibrilar

foarte fin. Aceste fibre au fost numite și *fibre protoplasmice* sau *epitelio-fibrile*, deoarece sunt caracteristice pentru toate epiteliile polistratificate și se consideră că ele ar fi formate în interiorul celulei, fiind un produs al citoplasmei.

Sistemul de epitelio-fibrile are și funcție de susținere, care dă posibilitatea celulelor epidermice de a desfășura o activitate vitală nestingherită de acțiuni mecanice exercitate asupra organismului din mediul exterior, cu care epidermul este permanent într-un contact nemijlocit.

Stratul granulos este format din 1–5 rânduri de celule aplatizate, în paralel cu suprafața epidermului, despărțite între ele prin spații strânse, a căror nucleu zbârcit, prezintă semne de degradare. Citoplasma celulelor conține fibrile numai în zona periferică și este plină cu granule mari, cromofile (cu afinitate față de coloranții bazici), de natură proteică, de *keratohialină*, precursor al keratinei și lipide care formează grăsimea epidermică. Celulele din partea superioară a stratului granulos se apropie, din ce în ce mai mult, de forma celor din stratul cornos, iar nucleul lor abia se mai recunoaște.

Stratul lucios este clar, refringent, format din mai multe rânduri de celule turtite, translucide, în care nucleii sunt aproape invizibili. Se observă, cu ușurință, în zonele de pe corp unde epidermul este mai gros, el reprezentând de fapt o zonă de tranziție între straturile granulos și cornos. În celulele de la partea superioară a stratului lucios, keratohialina s-a transformat într-o substanță uleioasă, *elaidina*, care se transformă apoi în keratină. Celulele stratului lucios conțin și o substanță uleioasă ce poate rezulta din degradarea lizozomilor și imprimă stratului lucios o anumită impermeabilitate. Această grăsime este probabil *paraelaidina*, care se găsește și în stratul cornos.

Stratul cornos se poate divide în *stratul cornos propriu-zis* și *stratul exfoliator*.

Stratul cornos este compus din celule moarte, care conțin keratină ca și paraelaidina. Este format, în medie, din 4–8 rânduri de celule, iar în unele zone ale corpului (palme, tălpi, spate, abdomen) poate atinge 15–20 de rânduri.

Stratul exfoliator este stratul de la suprafața epidermului, în care celulele au formă de solzi, extrem de slab unite între ele, motiv pentru care se desprind cu ușurință. Între stratul exfoliator și stratul cornos este greu să se facă o delimitare, pentru care motiv, uneori, este tratat ca făcând parte din stratul cornos.

Grosimea epidermului nu este uniformă pe tot corpul.

La om, epidermul este mai gros pe tălpi, palme, abdomen și pe spate [3].

14.3. PĂRUL

Părul este un produs al epidermului, care ia naștere în procesul de keratinizare și este caracteristic mamiferelor.

Părul este cornos, filiform, flexibil și se compune dintr-o porțiune liberă numită *tijă* sau *tulpină* și o porțiune profundă, înfiptă oblic în piele, numită *rădăcină*, care se termină printr-o umflătură ovoidală, numită *bulb*.

În partea cea mai profundă, rădăcina părului prezintă o excavație, care îmbracă un nodul dermic, conjunctivo-vascular, numit *papila părului*.

Rădăcina părului este cuprinsă într-un sac numit *folicul pilos*, care este format din două teci de natură epitelială și una de natură fibroasă (Fig.14.3.).

Dezvoltarea părului începe în stadiul embrionar și constă inițial dintr-o elaborare mai accentuată a celulelor ectodermice, în locurile unde se va dezvolta părul, luând naștere muguri ectodermici. Acești muguri constituie germeni din care se vor dezvolta rădăcina părului și firul de păr propriu-zis. Celulele ce constituie foliculul pilos se aseamănă, din punct de vedere al stratificației, cu epidermul, straturile de celule fiind dispuse însă concentric.

Porul părului este căptușit cu celule de aceeași formație cu a epidermului exterior, pereții porului fiind formați din celule complet keratinizate. Această căptușeală cornească a porului, care îmbracă firul de păr, se numește *teaca exterioară a rădăcinii părului*.

În jurul foliculului pilos, este o rețea de fibre colagenice fine ca aspect aproape de membrană, care îmbracă foliculul pilos, în special, în jurul bulbului. Această îmbrăcăminte de țesut conjunctiv este identică cu zona de limită între epiderm și derm.

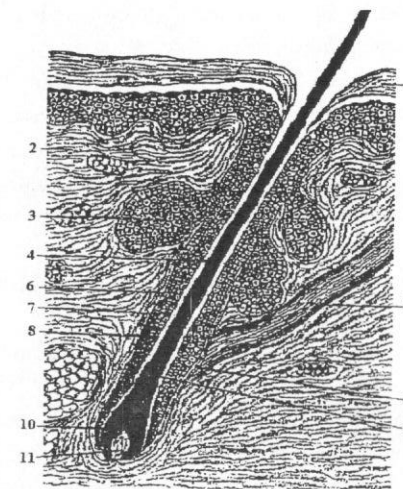


Fig. 14.3. Secțiune longitudinală într-un fir de păr.

1. Epidermul; 2. Dermul; 3. Glanda sebacee; 4. Stratul exterior al părului (cortexul); 5. Mușchiul erector; 6. Invelișul dermic; 7. Teaca internă a rădăcinii părului; 8. Teaca externă a rădăcinii părului; 9. Măduva părului; 10. Bulbul părului; 11. Papila părului.

La părul gros, se pot recunoaște fibrele colagenice și elastice, care formează țesutul conjunctiv ce înconjoară bulbul părului; ele au o orientare atât inelară în jurul foliculului pilos, cât și longitudinală, în direcția firului de păr.

La baza foliculului pilos, împletitura de fibre conjunctive este întreruptă de aglomerarea de celule ce formează papila (vase sanguine și nervi), care vin la rădăcina părului.

14.3.1. CONSTITUȚIA FIRULUI DE PĂR

Firul de păr propriu-zis este alcătuit din elemente celulare ca și epidermul, dispuse concentric în trei straturi, care prezintă diferite stadii de keratinizare: *măduva* sau *substanța medulară*, *scoarța* sau *substanța corticală* și *cuticula*.

sau *epidermicula*.

14.3.1.1. MĂDUVA

Măduva sau medula constituie partea centrală a filamentului pilos și este prezentă începând cu extremitatea dinspre papila dermică până aproape de extremitatea liberă a părului, subțindu-se treptat (Fig.14.4. și Fig.14.5.).

Măduva este formată din 2-4 rânduri de celule mari, de formă globulară, plină cu pigmenți și materii grase, care iau naștere prin diferențierea celulelor epiteliale dispuse pe vârful papilei.

În partea inferioară a măduvei, celulele sunt unite prin punți intercelulare. În partea superioară, celulele măduvei conțin o substanță granuloasă, analoagă cu keratohialina, numită *trichialina*.

Prin keratinizare, celulele se transformă adesea în vezicule uscate, pline cu aer. Dezvoltarea măduvei în firul de păr prezintă variații mari în funcție de natura părului, vârstă, specie etc. În firul de lână de oaie, măduva lipsește complet, în timp ce la părul de capră, măduva reprezintă majoritatea dintre componentele părului.

Greutatea medulei din firele de păr de iepure și cangur este de 13-14% din greutatea totală a firelor de păr, dar volumul ocupat de măduvă este mult mai mare din cauza densității mici, în comparație cu celelalte straturi ale firului de păr.

Prin microscopia electronică s-a constatat că medula este amorfă. Ea conține o cantitate mică de cistină și o cantitate mare de citrulină.

14.3.1.2. SCOARȚA SAU STRATUL CORTICAL

Stratul cortical reprezintă stratul median al firului de păr și constituie masa principală (85%) a filamentului pilos, precum și suportul mecanic al părului. Celulele epiteliale, de pe vârful papilei (celulele matrix), constituie stratul elementelor scoarței firului de păr.

Celulele ce constituie scoarța sunt de formă alungită (fuziforme) și conțin un nucleu în formă de bastonaș.

În citoplasma acestor celule se găsesc epiteliiofibrile keratinizate, orientate paralel cu axul părului și care leagă celulele între ele. Citoplasma acestor celule mai conține și pigmenți sub formă de granule fine de melanină, care sunt dispuse printre epiteliiofibrile.

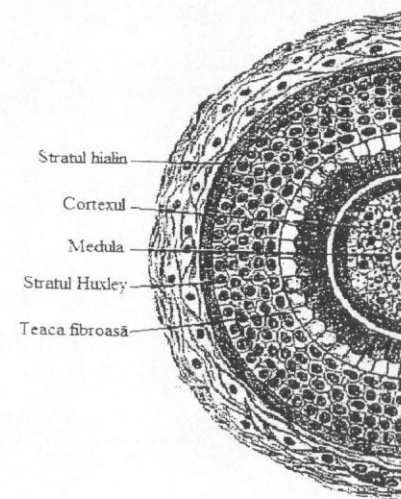


Fig. 14.4. Secțiune transversală prin firul de păr

În funcție de cantitatea și dispunerea acestor granule, părul se prezintă variat colorat: negru, castaniu, blond. Părul slab colorat conține pigmentul sub formă dizolvată. Prin distrugerea granațiilor pigmentare părul se deschide la culoare.

Cortexul cuprinde două substraturi: *ortocortexul* și *paracortexul*.

Paracortexul din lână reprezintă 30-50% din totalul cantității de cortex.

La granița dintre ortocortex și paracortex se găsesc, uneori, într-un mic procent (1-4%) din secțiunea transversală a cortexului, celule care au o morfologie intermediară între celulele ortocortexului și paracortexului. Acestea au fost numite celule *mezocorticele* (*stratul mezocortex*).

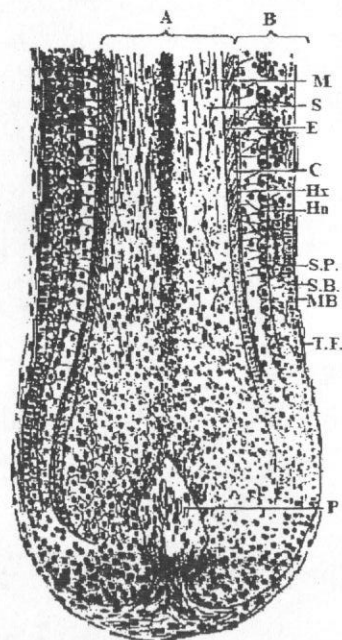


Fig. 14.5. Secțiune longitudinală în rădăcina părului: A. părul; B. foliculul pilos; M. măduva; S. scoarța; E. epidermicula; C. epidermicula tecii; Hx. stratul Huxley; Hn. stratul Henle; S.P. stratul celulelor poliedrice ale tecii epiteliale externe; S.B. stratul bazal al tecii epiteliale externe; M.B. membrana bazală; T.F. teaca fibroasă; P. papila.

Volumul ocupat de structura fibrilară în paracortex (epiteliofibrili) este de circa 50%, iar în ortocortex de circa 80%.

Se pare că celulele paracorticele ar avea un conținut mai mare de cistină decât celulele ortocorticele. Structura chimică a epiteliofibrililor ortocortexului este diferită de a celor din paracortex. Paracortexul poate fi colorat preferențial prin folosirea unei soluții de plumbit de sodiu, printr-un tratament cu vapori de mercur, cu soluții amoniacale de săruri de mercur, soluții aurice

sau săruri de argint. Colorarea paracortexului, în toate aceste cazuri, are loc, probabil, datorită conținutului ridicat în cistină.

Datorită faptului că ortocortexul are o rețea mai deasă de epiteliofibrile și un conținut mai scăzut în cistină decât paracortexul, este mai reactiv decât acesta și se umflă mai puternic la valori de pH depărtate de punctul izoelectric.

Ortocortexul se dizolvă mai ușor decât paracortexul la tratamente cu acizi urmate de extracții cu soluții apoase sau alcoolice de alcalii, cu soluții de uree și bisulfid de sodiu, soluție de sulfid de sodiu și acid peracetic, oxidare urmată de un tratament cu amoniac sau bicarbonat de sodiu etc.

Singurul tratament care afectează paracortexul, mai mult decât ortocortexul, este oxidarea cu acid peracetic sau cu apă de brom, care duce la apariția mai multor grupe sulfid în paracortex. De asemenea, în aceste condiții, paracortexul se umflă mai puternic.

14.3.1.3. CUTICULA

Cuticula sau epidermicula ia naștere prin diferențierea celulelor epiteliale situate lateral față de papila dermică. Cuticula părului este formată din celule poligonale lățite; subțiri, keratinizare, care au formă de solzi. Aceste celule sunt dispuse una peste alta, ca țiglele de pe casă. Firele de păr la care solzii nu sunt așezați sub formă inelară, sunt mai netede și mai lucioase. Firul de lână are până la 60–80 de solzi pe 1 mm lungime.

Celulele cuticulei formează trei straturi distincte: *epidermicula*, *exocuticula* și *endocuticula*.

Celulele sunt separate unele de altele și de cortex, de o membrană celulară similară aceleia care separă celulele corticale între ele.

Epidermicula este o membrană subțire, care acopere suprafața externă a firului de păr, are o rezistență chimică mare și conține 80% proteine și 5% lipide.

Exocuticula reprezintă 50–70% din cuticulă, este un strat dens și are un conținut ridicat de sulf, în comparație cu celelalte straturi ale cuticulei.

Endocuticula se găsește sub exocuticulă și este separată de cortex printr-o

membrană celulară, similară aceleia care separă celulele corticale între ele.

Din punct de vedere chimic, cuticula este stratul cel mai rezistent al firului de păr, deoarece celulele sale sunt keratinizate de tip cornos. Cuticula reprezintă 2–10% din fibra de lână.

14.3.1.4. FOLICULUL PILOS

Foliculul pilos este alcătuit, din interior către exterior, din două teci: *internă* și *externă*, ambele de natură epitelială și sunt învelite în teaca fibroasă (Fig.14.5.).

Teaca internă a foliculului pilos învelește rădăcina părului de la extremitatea inferioară a bulbului până în zona unde se deschide glanda sebacee în folicul. Prin teaca internă a foliculului pilos, părul este legat de piele. Teaca internă ia naștere prin diferențierea celulelor epiteliale situate pe laturile papilei. Aceste celule sunt cu atât mai puternic keratinizate, cu cât sunt mai apropiate de suprafața pielii. Keratinizarea lor se face prin intermediul trichohialinei.

La nivelul glandei sebacee, celulele ce alcătuiesc teaca interioară a foliculului pilos, ca și cele care formează stratul cornos al epidermului se desprind, se amestecă cu grăsimea secretată de glanda sebacee și sunt eliminate prin canalul pilos de la suprafața pielii. Teaca internă a foliculului pilos prezintă, în partea inferioară, trei straturi de celule keratinizate dispuse concentric, care, privite din interior către exterior sunt: *cuticula tecii interne*, *stratul Huxley* și *stratul Henle*.

Aceste trei straturi de celule se dezvoltă, ca și părul, de jos în sus. Ele nu se formează unul din altul, cum se întâmplă în cazul straturilor epidermului, ci iau naștere simultan din celulele de la baza rădăcinii părului, aranjate concentric în jurul papilei. Aceste straturi de celule se dezvoltă odată cu părul și se contopesc apoi într-un singur înveliș cilindric, omogen și transparent, format din keratină, care se deosebește de keratina care formează firul de păr, din punct de vedere chimic. Teaca interioară a învelișului pilos se colorează diferit în comparație cu firul de păr propriu-zis.

Cuticula tecii interne a foliculului pilos este formată dintr-un singur rând de celule, sub formă de solzi foarte subțiri, keratinizate, cu nuclee turtite și alungite transversal. Ele sunt dispuse unele peste altele ca țiglele de pe casă, marginea lor liberă fiind orientată în jos, spre bulb, deci invers decât la cuticula filamentului pilos, ceea ce face ca secțiunea verticală prin teaca internă a foliculului pilos să se prezinte crestată.

Prin această orientare a celulelor sub formă de solzi, ce alcătuiesc cuticula filamentului pilos, se realizează o legătură foarte rezistentă între firul de păr și teaca internă a foliculului pilos (Fig.14.6.). Datorită structurii celor două cuticule, la smulgerea părului din piele, firul de păr iese împreună cu teaca internă a foliculului pilos.



Fig.14.6. Angrenarea dintre teaca internă și cuticulă: a. măduva; b.scoarța; c. cuticula; d.cuticula tecii interne; e. teaca internă.

Stratul Huxley este format din 1–6 rânduri de celule poliedrice, dispuse radial; citoplasma lor conține elaidină și trichohialină.

Stratul Henle este format dintr-un singur rând de celule, clare, poliedrice, lățite transversal, fără nuclee vizibile. Între celule, sunt spații în care pătrund expansiunile celulare periferice ale stratului Huxley. Celulele acestui strat

conțin trichialină și se keratinizează primele.

Teaca externă a foliculului pilos reprezintă o simplă continuare a epidermului, care se răsfrânge la nivelul gâtului foliculului pilos și se prelungește până la baza papilei părului, subțindu-se din ce în ce mai mult. La exterior, teaca externă a foliculului pilos este limitată de o membrană, care este o continuare a membranei hialine și desparte dermul de epiderm.

Teaca fibroasă constituie un înveliș de natură conjunctivă, ce acoperă rădăcina firului de păr și care se continuă cu dermul.

Extremitatea cea mai profundă a tecii fibroase este formată dintr-un țesut conjunctiv tânăr, fără fibre elastice și pătrunde în excavația bulbului părului, constituind papila. Existența părului este strâns legată de buna funcționare a papilei și în general, de integritatea acesteia.

14.3.1.5. MUȘCHIUL ERECTOR

Mușchiul erector ridică părul aproape perpendicular cu suprafața pielii (zbârlirea părului). Acesta este situat în unghiul format de rădăcina părului și suprafața cutanată și leagă sacul fibros al rădăcinii părului cu stratul papilar al dermului, trecând pe sub glanda sebacee.

La animale, în învelișul lor pilos, se găsesc, în unele regiuni ale corpului, fire de păr cu funcție tactilă. În tecile acestor peri, care sunt de obicei lungi și rigizi, ajung fibrele nervoase senzitive.

14.3.1.6. FORMA ȘI CULOAREA PĂRULUI

Forma părului depinde de forma foliculului pilos. Părul creț are foliculul pilos răsucit sau curbat, ceea ce face ca părul să se curbeze în spirală atunci când crește și iese din folicul.

Perii care alcătuiesc învelișul pilos al mamiferelor, se deosebesc prin caracteristicile lor morfologice, în funcție de specia animalelor, după: grosime, lungime, structură și calități particulare.

Din punct de vedere al formei, firele de păr pot fi de patru tipuri: fuzifor-

me, cilindrice, conice și în formă de lance [4].

Culoarea părului este determinată de interacțiunea a trei factori: conținutul în pigmenți melaninici din celulele stratului cortical și a măduvei părului, proprietățile de refringență ale cuticulei și ale stratului cortical și structura măduvei, respectiv conținutul în aer dintre celulele măduvei.

Sediul pigmentilor este măduva și stratul cortical. Cuticula părului și cuticula tecii interne a foliculului pilos sunt lipsite de pigmenți. Pigmenții sunt colorați în negru-brun. Culoarea diferită pe care o poate prezenta părul se datorește concentrației și repartiției pigmentilor la periferia sau în profunzimea filamentului pilos.

La părul negru, de exemplu, întreg firul de păr conține pigmenți; la părul brun, numai măduva, iar la părul roșcat, stratul cortical este pigmentat și măduva este plină cu aer interpus între celule.

Cuticula, prin structura sa, influențează culoarea părului. O cuticulă netedă (ca cea a părului de porc) face ca firul de păr să apară transparent, pe când o cuticulă aspră, datorită solzilor pe care îi posedă, determină o reflexie a luminii de pe suprafața părului, ceea ce face ca firul de păr să apară netransparent (lâna de oaie).

Prezența aerului în celulele măduvei sau între celule, determină o difuzie mai puternică a luminii și, în consecință, deschiderea culorii părului.

În lipsa pigmentilor, părul apare cu atât mai alb, cu cât măduva este mai bogată în bule de aer fin dispersate.

Înălbirea părului cu vârsta este determinată de dispariția pigmentilor și de micșorarea spațiilor cu aer, prin dispersarea lor din ce în ce mai fină, între celulele măduvei.

Substanțele organice colorate în negru-brun, care formează pigmenții pielii și ai părului, cunoscute sub denumirea de *melanină*, iau naștere în melanocite. Majoritatea melanocitelor sunt localizate în apropierea membranei bazale. Au un nucleu rotund cu membrană dublă. Membrana externă prezintă o formă neregulată, datorită numeroaselor granule care aderă la ea. Cele două membrane sunt separate între ele printr-o zonă de 500Å grosime.

În citoplasma melanocitelor se găsesc granule melaninice, de diferite mărimi, cu diametrul mediu în jur de 1μm. Aceste granule, în stadiul inițial, au aspectul unor vacuole umplute cu material fin, sub formă de lamele pliate. Foarte repede, aceste vacuole se măresc (aproximativ de două ori), iar în interiorul lor se depune un material dens, aproape solid; unele granule sunt alungite. În funcție de localizarea lor în melanocyte și de caracterul morfologic, se disting două tipuri de granule melaninice: unele constituite dintr-o masă densă ce posedă un înveliș brut și altele clare, din punct de vedere optic, cu o structură de rețea fină.

Sub denumirea de melanină, se includ acele substanțe organice, colorate în negru-brun, care au următoarele proprietăți:

- sunt polimeri, cu masă moleculară mare;
- sunt insolubile în aproape toți solvenții;
- sunt rezistente la tratamente chimice;
- au o structură chimică care nu este încă pe deplin elucidată.

Melanina este formată și localizată, cu predilecție, la organele citoplasmice, denumite melanozomi. Polimerul melaninic este puternic legat de proteine, formând astfel un complex melanino-proteic. Din punctul de vedere al structurii melaninei, cercetătorii care s-au ocupat de această problemă se situează pe trei poziții:

- melanina este o polichinonă formată prin oxidarea precursorilor fenolici;
- melanina se obține pe calea oxidării enzimatică a fenolilor;
- melanina se formează pe calea oxidării enzimatică pornindu-se de la precursori ca tirozina, 3,4-dihidroxifenilalanina, adrenalina și alți compuși de acest tip.

Melaninele animale sunt de tip indolic. Conform teoriei lui Mason, melaninele sunt compuse numai din unități indol-5,6-chinonă, care sunt legate între ele, formând un polimer (Fig.14.8). După Hempel, melanina ar putea fi un copolimer de Dopa-crom, indol-5,6-chinonă și acid indol-5,6-chinonă-2-carboxilic, în proporție de 3:2:1 (Fig.14.7.).

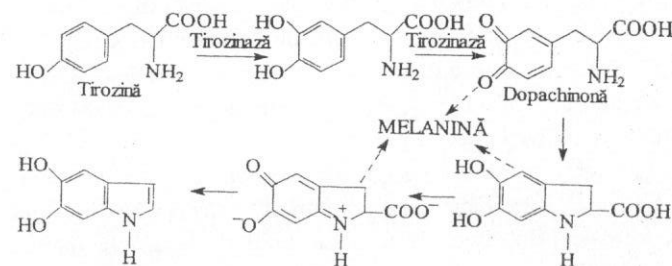


Fig. 14.7. Schema biosintezei melaninei

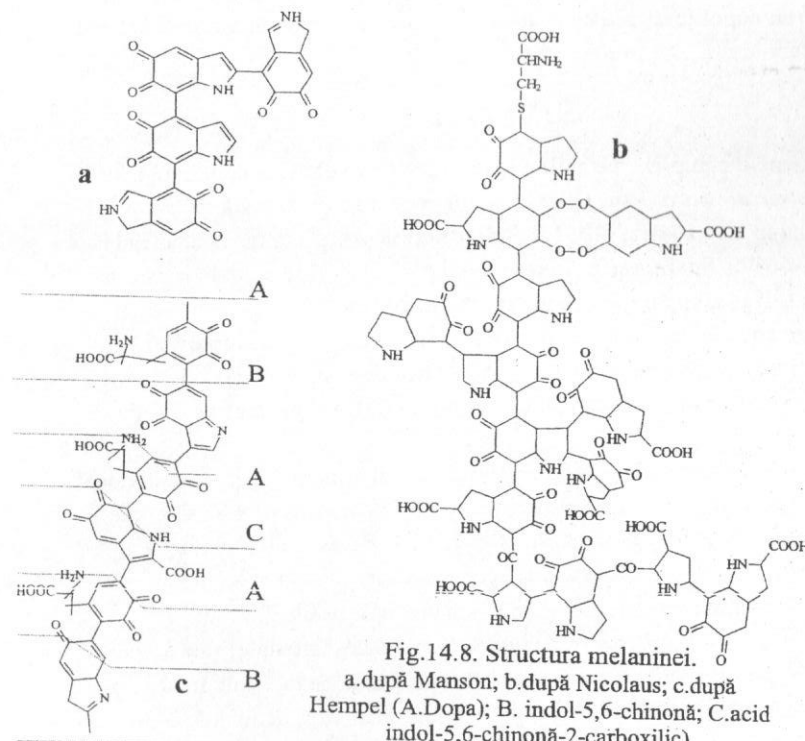


Fig.14.8. Structura melaninei.
a.după Manson; b.după Nicolau; c.după Hempel (A.Dopa); B. indol-5,6-chinonă; C.acid indol-5,6-chinonă-2-carboxilic).

Pe de altă parte, Nicolaus admite că melaninele, pe lângă indol-5,6-chinonă, conțin unități Dopa-crom și unități pirolice care iau naștere la scindarea oxidativă a ciclurilor benzenice din nucleii indolici în timpul melanogenezei.

Toate aceste fragmente se leagă, probabil, între ele, în diferite poziții, formându-se un compus cu un înalt grad de polimerizare.

Melaninele se găsesc întotdeauna sub formă de melanino-proteine. Proteina se pare că este legată de melanină prin legături puternice, printre care, legături tioeterice, formate prin intermediul aminoacizilor cu sulf, în special cisteină (Nicolaus), legături peptidice (Yasonobu). Produșii intermediari ai melanogenezei, generați de tirozină prin grupările tirozil terminale, se pot combina prin copolimerizare cu produșii intermediari rezultați din tirozină sau Dopa în stare liberă.

14.4. KERATINIZAREA

Fenomenele complexe ce au loc la diferențierea celulelor epiteliale poartă numele de *keratinizare*. Este sigur că acest proces se desfășoară diferit în diversele zone în care se dezvoltă. La astfel de concluzii s-a ajuns la analiza chimică a produșilor finali. Astfel, keratina din păr și din lână conține o cantitate ridicată de sulf în comparație cu keratina din epiderm.

De asemenea, există variate rezultate în diversele zone în raport cu substanța keratinică și cea nekeratinică. Astfel, celulele superficiale ale părului sunt constituite numai din keratină, în timp ce epidermul nu conține decât 60–70% keratină.

Conform unei teorii [5,6], sinteza evoluează, în principal, parcurgând două sisteme distincte care duc la două tipuri de keratină, una "moale" și alta "dură". Prima este caracteristică keratinizării epidermului, a celulelor medulare ale părului și a celulelor stratului bazal a foliculului pilos, când se trece de la celule epiteliale prin stadiul intermediar granular și vitros la celule întărite.

Al doilea tip de keratină se dezvoltă în celulele epiteliale, fără trecerea intermediară prin faza granulară și vitroasă, ajungându-se la celule întărite, așa cum se produce în celulele corticale ale părului, coarnelor, copitelor și gheare-

lor. În aceste condiții distincte de agregare s-au găsit cantități variate de sulf, care s-au dovedit a fi mai mici la keratina moale [7].

Studii de microscopie electronică au dovedit formarea a diverse tipuri de *keratină moale* și *keratină dură* (Fig.14.9. și Fig.14.10.).

Producerea keratinei moi ar avea inițial aparența unor filamente cu diametrul de circa 35 Å, asociate cu particule de Ribo-Nucleo-Proteine (R.N.P.). Succesiv, aceste filamente, mai exact tonofilamente, se vor uni între ele în mod perfect paralel, generând agregate cu diametrul de circa 60 Å.

Continuând creșterea și aglomerarea, se formează primele granule de keratohialină, cu participarea particulelor de R.N.P. Aceste granule își cresc dimensiunile, luând o formă neregulată, după care se asociază cu filamente de dimensiuni mai mari, procedându-se astfel la ultima stabilizare, forma finală.

Mecanismul de formare a keratinei dure pornește de la asocierea filamentelor cu particule de R.N.P. Urmează fuziunea filamentelor prin aranjarea lor paralelă, producerea de material stabilizant și formarea keratinei dure.

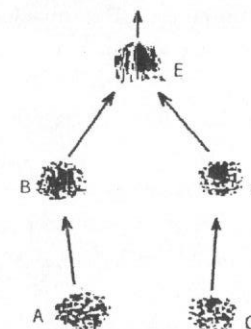


Fig. 14.9. Formarea keratinei moi.

- A. Tonofilamente asociate cu particule de R.N.P.;
- B. Tonofilamentele cresc ca proporție de agregare;
- C. agregarea filamentelor se extinde și are loc fuziunea primelor granule de keratohialină;

- D. mărirea granulelor de keratohialină, secundată de R.N.P.;
E. unirea tonofilamentelor mari în granule de keratohialină, atingerea stadiului final de keratină "moale".

La cele două tipuri de keratină descrise, se asociază al treilea: *keratina amorfă* (Fig.14.11.). În acest caz, se formează, în asociație cu particulele R.N.P., corpuscule care se agregă desordonat generând material cuticular.

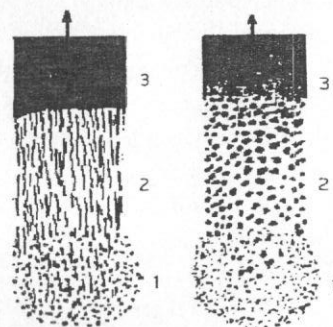


Fig.14.10. Formarea keratinei dure.

1. apariția tonofilamentelor asociate cu R.N.P.; 2. formarea filamentelor și asocierea lor cu materialul stabilizant; 3. asocierea filamentelor și formarea keratinei "dure".



Fig. 14.11. Formarea keratinei amorfe.

1. apariția de corpuri neregulate și omogene secundate de particule R.N.P.;
2. creșterea în lățime și în lungime; 3. fuziunea laterală a corpurilor și producerea keratinei amorfe.

În fiecare sistem, produsul final conține și substanțe nekeratinice (nuclee, resturi de protoplasmă, peptide, proteine, aminoacizi liberi, lipide, carbohidrați etc.), care rămân încorporate după stabilizare.

O ipoteză mai completă asupra procesului de keratinizare se bazează pe diferențierile celulare ce au loc în acest proces. Celulele epiteliale, cu o bogată activitate metabolică, traversează o serie de variații citomorfologice și fiziologice și, în final, generează materialul keratinic întărit. În acest mod, în fiecare structură morfologică se împerechează diverse stadii de keratinizare cu producerea de diverse tipuri de proteine.

Primul tip de mecanism care are loc la formarea keratinei amorfe se petrece concomitent cu diferențierea celulelor germinative, în celule speciale, care conțin granule citoplasmatiche amorfe. Asemenea celule se formează fără a genera filamente, dând succesiv loc la un trunchi celular de circa 300Å, care se lărgeste până la formarea celulelor mature care conțin keratina amorfă într-un raport de 2/3 din total. Conținutul în sulf al keratinei amorfe este ridicat și, de aceea, are o bună rezistență față de reactivii oxidanți și reducători.

Al doilea mecanism de keratinizare, caracteristic pentru cortexul firului de păr sau de lână, parcurge stadiile evidențiate în figura 14.12.

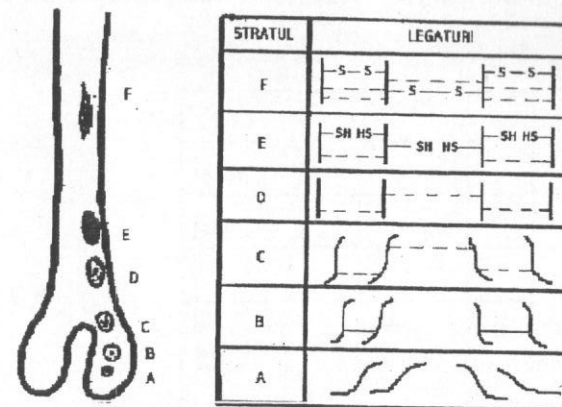


Fig.14.12. Dezvoltarea keratinei din păr.

- A. matricea; B. zona de preelongație; C. zona de elongație; D. zona de prekeratinizare; E. zona de keratinizare; F. cortexul matur.

La sinteza keratinei părului, keratina dură, se presupune că își are începutul în formarea de precursori în stratul bazal al bulbului părului, unde probabil este locul formării primelor filamente submicroscopice, care în zonele următoare generează fibrili necristalini (zonele B și C). În zona de prekeratinizare, ia naștere prima formă cristalină, iar fibriliile așezați paralel între ei, ca acei din keratina matură, sunt legați mai puțin stabil. La nivelul zonei de keratinizare (zona E), agregarea moleculelor de keratină apare aproape completă și filamentele se prezintă imersate într-o matrice constituită dintr-o micelă proteică, legate între ele prin punți disulfidice [8] și au unele zone bogate în sulf [9, 10], iar altele în glicină și tirozină [11, 12]. Până în stadiul final de stabilizare, se formează legături $-S-S-$, legături de hidrogen, saline, hidrofobe și de tip van der Waals, care întăresc celulele cortexului. La stabilizare, se prevede și formarea unor legături de tip $\epsilon-N(-\gamma - \text{glutamil})-1-\text{lizină}$.

Al treilea mecanism se dezvoltă cu prioritate în epiderm, unde iau naștere celule care sintetizează fibrile citoplasmice și granule (keratohialină) (Fig.14.13.).

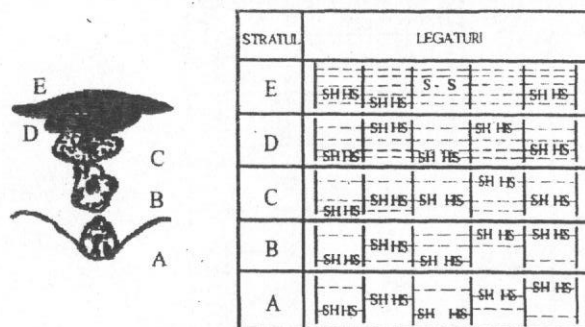


Fig.14.13. Dezvoltarea keratinei în epiderm.
A. stratul bazal; B. stratul spinos; C. stratul granulos;
D. stratul lucios; E. stratul cornos.

Keratina care se formează în epiderm, în stadiul inițial, studiată prin difracție cu raze X, s-a dovedit a fi de forma α . Ea este prezentă în fibriliile ce sunt formați prin agregarea a numeroase filamente. O astfel de formă s-a dovedit a nu avea legături covalente de tip $-S-S-$, ci numai grupe tiolice $-SH$, apoi legături de hidrogen, hidrofobe și forțe van der Waals. Temperatura de contracție a straturilor ce conțin keratina (stratul Malpighi) este de circa 65°C , cu 20°C mai puțin față de stratul cornos. În zona granulară, componenta macromoleculară se hidrolizează și succesiv se resintetizează, prin generarea unei noi structuri a precursorului keratohialina, care la microscopul electronic se prezintă sub formă de filamente dens împachetate împreună, formând granule cu diametrul de $100-250\text{\AA}$. Nu sunt prezente grupa tiolică și grupa disulfidică, care sunt absente și în stratul lucios. Stratul cornos, final, conține grupe $-SH$ și $-S-S-$ și de aceea are o temperatură de contracție de 85°C .

Prin analogie cu keratina din păr, keratina din stratul cornos este imersată într-o matrice interfilamentară [13-17] compusă dintr-un grup de proteine bazice, bogate în histidină [18-22], lipsite de metionină și cu proprietăți imunologice asemănătoare filagrinei, a cărei precursor fosforilat a fost regăsit în granulele de keratohialină [23-28].

Filagrina este responsabilă pentru agregarea filamentelor în procesul de keratinizare a epidermului.

P.M.Steinert a dovedit prezența grupelor disulfidice intracatenare în zonele mai profunde ale stratului cornos care se transformă, pe baza unui mecanism de desfășurare și înfășurare, în legături disulfidice intercatenare [29]. De asemenea, Steinert descopere în zona mai externă a epidermului, un izopeptid, $\epsilon-N(-\gamma - \text{glutamil})-1-\text{lizina}$, evidențiind continua modificare suferită de keratină din momentul biosintezei sale [30].

Produsul final nu prezintă dublă refracție, dovadă că structura este împachetată dens și neseperată în limite bine definite. Difracția cu raze X arată o structură de tip α . Oxidarea grupelor tiolice la legăturile disulfidice este catalizată de o enzimă care conține cupru.

S-a considerat că diferența dintre păr și epiderm, care constă în organizare și stabilizare, pornește de la compoziția diferită în aminoacizi.

Mercer, Munger, Rogers și Roth dau următoarea definiție a keratinei: keratina este proteina produsă de celulele epiteliale și în general, se găsește încapsulată în celule [31], este insolubilă în solvenții uzuali ai proteinelor, din cauza prezenței a numeroase legături disulfidice. Keratina poate să fie cu precădere filamentosă, cu precădere amorfă sau un amestec de elemente filamentose și amorse.

O importantă contribuție la cunoașterea keratinei o reprezintă izolarea prekeratinei, o proteină fibroasă, un material din care s-au format filamentele birefringente și precede stadiul de formare a legăturilor transversale.

Un asemenea agregat, cu masa moleculară de 640000, a fost izolat de Matoltsy din epidermul pielii de vacă, prin extracție cu o soluție tampon de acid citric și citrat de sodiu [32].

Prekeratina constă dintr-o aglomerare de α -helixuri cu dimensiunile de $1050 \times 37 \text{ \AA}$ în proporție de 40%, cu o masă moleculară minimă de 50000, cu un conținut mic de grupe disulfidice, în timp ce cantitatea de sulf este consistentă.

Prekeratina supusă la limita de digestie triptică lasă să se separe la $\text{pH}=4,5$ din supernatant un precipitat consistent din patru fracțiuni, din care, numai primele două au caracter helicoidal.

14.5. STRUCTURA CHIMICĂ A KERATINELOR, COMPOZIȚIA ÎN AMINOACIZI DIN FIBRE ȘI COMPONENTII LOR MORFOLOGICI

Conținutul în aminoacizi al fibrelor de keratină, de diferite proveniențe, este dat în tabelul 14.1. Triptofanul lipsește, deoarece a fost distrus în timpul hidrolizei. Obșnuit, este prezent în lână într-o cantitate mică (0,5 moli/100 moli aminoacizi). Datele din tabelul 14.1. arată o variație considerabilă a conținutului de aminoacizi din fibrele de keratină prezentate. Aminoacizii cu o variație mai mare de 10% de la medie, în ordinea descrescătoare a mărimii, sunt: histidina, metionina, acidul asparagic, izoleucina, tirozina, acidul cisteic + cistina și glicina.

Tabelul 14.1.

Conținutul în aminoacizi a fibrelor de keratină
(moli / 100 moli aminoacizi)

Aminoacidul	Lână Merinos	Mohair	Păr de iepure	Păr de focă	Păr de om
Alanină	5,3	5,8	5,0	4,7	4,5
Arginină	6,8	7,0		6,2	6,3
Acid asparagic	6,4	6,5	5,3	5,2	5,3
Citrulină+ornitină	0,1	0,0	1,0	0,1	0,1
Acid cisteic	0,1	0,2	-	0,3	0,3
Cistină	10,5	9,6	-	16,1	16,3
Acid cisteic + cistină	10,6	9,8	13,7	16,4	16,6
Acid glutamic	11,9	13,1	12,7	9,7	12,5
Glicină	8,6	7,1	8,3	11,7	5,8
Histidină	0,9	0,8	1,7	0,8	0,8
Izoleucină	3,1	3,7	2,4	2,5	2,6
Leucină	7,7	7,8	6,6	7,2	5,9
Lizina	3,1	2,8	2,7	2,2	2,4
Metionina	0,5	0,5	0,8	0,9	0,5
Fenilalanina	2,9	2,7	2,8	1,9	1,7
Prolina	5,9	6,5	7,7	7,0	8,2
Serina	10,2	10,3	10,4	10,4	11,9
Treonina	6,5	6,7	6,2	6,0	7,1
Tirozina	4,0	2,9	2,6	4,0	2,1
Valina	5,5	6,0	4,0	4,5	5,4

Cuticula conține următorii aminoacizi în cantități mai mari decât fibra în totalitate sa: prolina (52%), valina (32%), serina (29%) și glicina (52%) și mai puțină metionină (50%), acid asparagic (42%), fenilalanină (39%), tirozina (39%), izoleucină (31%), leucină (26%) și treonină (21%).

În medulă se găsesc cu 20% mai mult decât în fibra de keratină următorii aminoacizi: tirozina, metionina, prolina și lizina.

Conținutul în aminoacizi ai celulelor corticale este aproape același cu al fibrelor de la care provin, deoarece cortexul reprezintă cel puțin 70% din greu-

tatea fibrei de keratină (circa 85% în cazul lânii de Merinos).

Paracortexul conține mai mult acid cistic+cisteină (26%), treonină (15%) și prolină (11%), în comparație cu ortocortexul, iar ortocortexul conține mai multă tirozină (42%), fenilalanină (23%), glicină (18%), leucină (15%) și acid asparagic(6%), în comparație cu paracortexul. Aceasta explică multe din diferențele observate între proprietățile paracortexului și ortocortexul lânii fine.

Complexul membrană celulară din lâna fină conține circa 0,8% lipide, 1% proteine, care au foarte puține legături disulfidice, sunt ușor extrase cu acizi organici (acid formic sau amestec de acid formic și apă) și conțin un procent ridicat de glicină și tirozină.

Rezistența chimică mare a medulei este pusă pe seama legăturilor transversale, dintre lanțurile polipeptidice de keratină, ale resturilor de lizină și acid glutamic.

14.6. STADIILE DE ORGANIZARE ALE KERATINEI DIN PĂR

a. *Fibra* este porțiunea din păr care iese în afara epidermului, incluzând cuticula, cortexul și măduva.

b. *Fibrila* este unitatea de bază a fibrei și este formată din *microfibrile* sau *filamente*. Fibrilele pot fi vizibile la microscopul optic.

c. *Microfibrila* sau *filamentul* se compune din 11 protofibrile așezate după modelul "9 + 2" (Fig. 14.14. și 14.15.) și are diametrul de 50–100Å.

d. *Protofibrila* sau *protofilamentul* are diametrul de 20Å și intră în compunerea microfibrilei. Protofibrila α -keratinei este formată din trei lanțuri polipeptidice răsucite în formă de spirală. Perioada de repetiție este de 200Å (Fig.14.14.).

e. *Prekeratina* este o proteină fibroasă, care apare, ca filamente birefringente, în citoplasma celulelor germinative ale țesuturilor keratinizate. Aceste structuri sunt bogate în grupe -SH, dar nu conțin legături disulfidice. Prekeratina poate fi solubilizată fără o inițială reducere, oxidare, tratament alcalin etc., este solubilă în soluție tampon la pH=1,5–3,3 sau la pH=12.

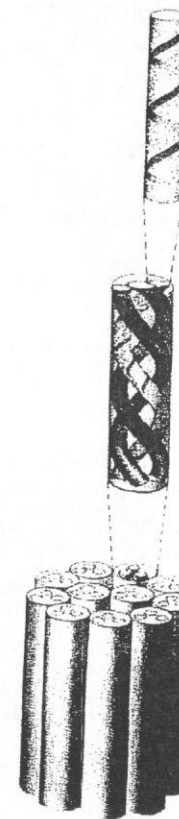


Fig. 14.14. Structura keratinei din păr
sus: α -keratina; la mijloc: protofibrila; jos: microfibrila (model: 9 + 2)

Constituției protofibrililor și organizării lor în cadrul microfibrililor i s-au atribuit soluții variate. Dintre acestea, demne de reținut sunt ipotezele prin care Crick (1952) conturează modelul unui triplu helix, iar Pauling și Corey

(1953) propun un sistem de șapte lanțuri polipeptidice înmănunchiate într-o spirală [33, 34].

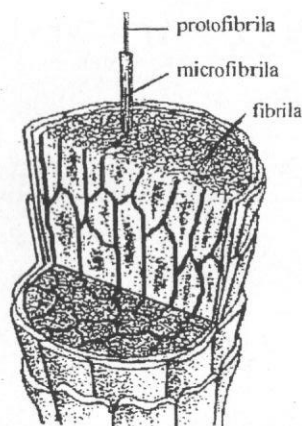


Fig.14.15. Structura firului de păr

În 1961, Swanbeck admite că microfibrilele sunt formate din mai multe lanțuri polipeptidice, care alcătuiesc straturi concentrice, cu o simetrie dispusă în jurul unei axe comune [35].

Modelul ar consta din cinci astfel de straturi, în care lanțurile polipeptidice ar fi dispuse helicoidal. Stratul interior ar fi constituit din trei lanțuri polipeptidice, al doilea din 7-8 lanțuri, al treilea din 10-11 lanțuri, al patrulea din 16 lanțuri și al cincilea strat ar conține 19 lanțuri polipeptidice.

Pentru fiecare strat adițional de lanțuri polipeptidice, structura helixului va fi mai laxă față de stratul adiacent anterior.

Diametrul microfibrililor este limitat astfel de posibilitatea de extensie a α -helixului. Distorsiunea structurii α -helicoidale a lanțurilor polipeptidice este neglijabilă în primele două straturi din interior, în stratul al treilea crește ușor, iar straturile patru și cinci ar putea conține lanțuri polipeptidice cu structură β .

Acest sistem de multilanțuri poate ajunge la un diametru de 50 Å. În cazul existenței lanțurilor polipeptidice cu structură β , diametrul microfibrilelor poate fi de până la 80 Å.

Fibrilarea keratinelor prin tratamente chimice, urmate de tratamente ultrasonice, a condus la observația lui Dool că filamentele au un diametru de 25 Å și că ele se unesc prin legături laterale.

S-a arătat deja că protofibrila este formată din trei lanțuri polipeptidice, răsucite în formă de spirală. Alte cercetări, cum sunt cele ale lui Fraser, arată că protofibrila reprezintă o înfășurare în "funie" a două α -helixuri, care, după alți autori, poate să fie cea mai probabilă.

Keratina se găsește sub trei forme: α , β , și γ (supracontractată), care se deosebesc, în special, prin lungimea catenei.

După Astbury, forma α este de două ori mai scurtă decât forma β .

14.6.1. STRUCTURA α -KERATINEI

Keratina lânii și, în general, a părului, trece prin întindere mecanică în structură β . În stare nativă, catenele peptidice sunt mai puternic îndoit. În diagrama Röntgen a fibrei, reflexia meridională corespunde unei perioade de identitate de numai 5,15 Å, în timp ce distanța ecuatorială între diferitele subunități este de 9,5 Å, care amintește de structura "foii plisate" de la β -keratină (Fig.14.16.).

Pentru α -keratină, Astbury și Bell [36] au propus o structură mai puternic îndoită decât la β -keratină, stabilizată prin punți de hidrogen, cu perioada de identitate bine stabilită, sub formă de helix sau șurub (Fig.14.17.). Helixul se formează prin rotație sau translație.

L. Pauling a propus, pe baza unor modele foarte exacte, că o spiră din lanțul polipeptidic al α -keratinei este formată din 3,6 aminoacizi (Fig.14.18.).

Structura propusă de Pauling și Corey îndeplinește toate cerințele privitoare la unghiuri de legătură, lungimi de legătură, număr de punți de hidrogen, precum și dispunerea legăturilor peptidice și poate să explice, cel puțin cu aproximație, distanțele din diagramele Röntgen.



Fig. 14.16. Diagrama Röntgen a fibrei de α -keratină.

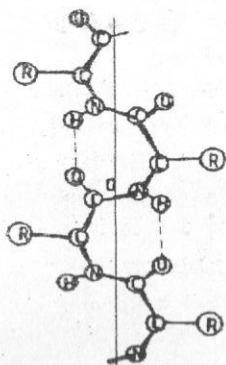


Fig. 14.17. Structura helicoidală a α -keratinei.

cu 0,1 Å mai mari decât razele van der Waals ale atomilor înșiși. Spațiul intern al helixului este deci foarte mic.

Studiile cu raze Röntgen au dovedit că α -helixul are forma unui șurub de dreapta, la care spiralele se desfășoară în sensul acelor de ceasornic.

Pauling și Crick au arătat că mai multe helixuri sunt răsucite împreună, formând un suprahelix (Fig. 14.19.), care determină ca helixul izolat să apară

Între atomul de azot al unei legături peptidice și grupa CO al celui de al treilea aminoacid, care urmează, este o punte de hidrogen care încheie, în același timp, un segment de elice de 13 atomi. Conform nomenclurii lui Brag și colab. [37], pentru caracterizarea helixului, se scrie numărul de aminoacizi dintr-o spirală și se pune ca indice numărul de atomi necesari pentru aceasta, legați covalent.

Astfel, helixul de α -keratină are simbolul 3,6₁₃. Perioada de identitate a helixului, adică punctul în care se ajunge din nou la aceeași dispoziție spațială a lanțului în direcția axei helixului, este formată din 18 aminoacizi, care sunt conținuți în 5 spire. Spirele sunt la o distanță de 5,5 Å una de cealaltă, iar perioada de identitate este deci de 27,2 Å.

La analiza cu raze Röntgen s-a dovedit că fiecare legătură peptidică dintr-un lanț polipeptidic de α -keratină urmează celei premergătoare la o distanță meridională identică, de 1,47 Å, măsurată pe axa centrală a elicei.

Distanța atomilor de C, N și O din scheletul peptidic de la centrul elicei este de 1,57 Å până la 1,76 Å. Aceste raze sunt numai

prescurtat.

Deoarece catenele laterale ies în evidență de-a lungul helixului, se poate obține o împachetare optimă, dacă mănunchiurile sunt unite în mod înclinat și așezate unul opus față de celălalt [34].

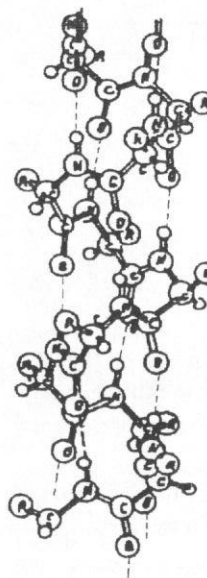


Fig. 14.18. Structura α -helixului de α -keratină.

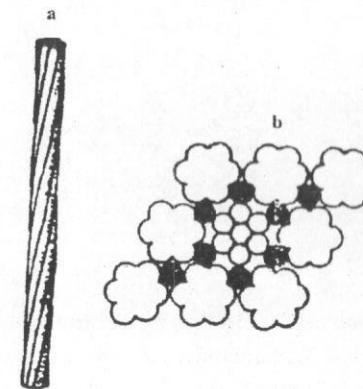


Fig. 14.19. a. α -Helixuri izolate, răsucite într-un suprahelix;
b. Structura α -keratinei formată din 7 mănunchiuri de α -helixuri izolate (hașurate).

Multe α -keratine prezintă secvențe monotone, care se formează prin repetarea regulată a câte 3 până la 5 aminoacizi. Un astfel de bloc nu va permite lungimi regulate de legătură a punților de hidrogen, ci va determina mici variații, care se vor repeta de-a lungul helixului.

Prin aceasta, se imprimă structurii un *suprahelix*.

Propunerea lui Pauling și Crick pentru structura α -keratinei s-a dovedit a fi prea simplă [38]. Prin conlucrarea dintre microscopia electronică și analiza Röntgen s-au pus în discuție încă alte structuri posibile. Astfel, imagini Röntgen de dispersie ale keratinei au pus în evidență perioade de identitate foarte lungi, de 197Å.

Acestei perioade i s-ar potrivi o structură din trei mănunchiuri. Crick a dovedit că un astfel de mănunchi sau *protofibrilă* este format din 3 α -helixuri de α -keratină, iar 3 protofibrile formează o *microfibrilă*, care se găsește fixată într-o substanță interfibrilară amorfă, bogată în proteină, care conține mai mulți aminoacizi cu sulf decât protofibrilele.

Diametrul unei protofibrile este în jur de 70Å.

O altă structură de microfibrilă poate consta în 9 + 2 protofibrile (nouă protofibrile sunt așezate în cerc și două la mijloc).

14.6.2. STRUCTURA β -KERATINEI

Cea mai simplă dispoziție pentru o catenă peptidică propusă pentru structura keratinelor β este un fir, cât se poate de întins, de la care pornesc alternativ, în direcții opuse, catenele laterale ale aminoacizilor (Fig.14.20.).

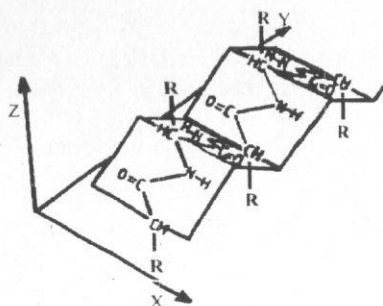


Fig.14.20. Structura de foii plisate a β - keratinei.

Pe fiecare parte a lanțului peptidic, distanța între catenele laterale este de 7,23Å, în timp ce catenele laterale care alternează sunt depărtate la 3,61Å. Aceste valori nu corespund exact perioadelor de identitate de 6,68Å și 3,3Å găsite la keratina β în direcția fibrei. Explicația că lanțurile nu sunt complet întinse în aceste proteine fibroase este plauzibilă. Deoarece legăturile peptidice au o poziție planară, prescurtarea lanțului peptidic este explicată prin îndoirea în dreptul atomilor C α . De la acest argument s-a dezvoltat structura "foii plisate" (*cutate*), în care catena peptidică este îndoită în dreptul atomilor C α , după un unghi preferat [39].

Structura de foii plisate presupune că atomii de hidrogen ai legăturii peptidice fac punți între lanțurile peptidice învecinate. Keratinele β sunt formate din mai multe catene peptidice alăturate, fixate prin punți de hidrogen (Fig. 14.1.).

Fiecare grupă peptidică formează câte o legătură de hidrogen la două lanțuri diferite. Această posibilitate face să apară problema dacă lanțurile așezate, unul lângă altul, se află în același sens (*paralele*) sau în sens opus (*antiparalele*). Dacă se admite această ipoteză, înseamnă că perioada de identitate, stabilită pe model, în cazul lanțurilor antiparalele este de 7.0Å și la lanțurile paralele de 6,5Å. Întrucât keratinele β prezintă perioada de 6,68Å, există probabil ambele posibilități.

14.6.3. STRUCTURA γ - KERATINEI

Dacă un fir de păr este supus acțiunii simultane de întindere și a vaporilor de apă, după încetarea tratamentului, se contractă, dar nu corespunzător configurației α , ci trece la o stare mai contractată, keratina γ .

Aceasta se întâmplă atunci când condițiile de tratament sunt mai energice și duc la anularea caracterului polar al resturilor de aminoacizi din catenele laterale realizându-se, în același timp și ruperea, cel puțin parțială, a punților disulfidice. În acest caz, desfacerea legăturilor disulfidice crează o stare labilă a moleculei, dar refacerea acestor legături nu duce la o stare identică cu cea inițială, ci la o stare de pliere mai accentuată, care scurtează fibra în raport cu

cea din configurația α . Se produce o supracontractie ireversibilă, cu stabilirea de noi legături intracatenare, stabile și permanente.

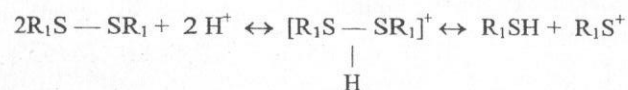
Modificările de configurație ale fibrei de keratină, trebuie corelate cu modificările structurale ale catenei polipeptidice și ale macromoleculei de keratină.

14.7. PROPRIETĂȚILE FIZICO - CHIMICE ALE KERATINELOR

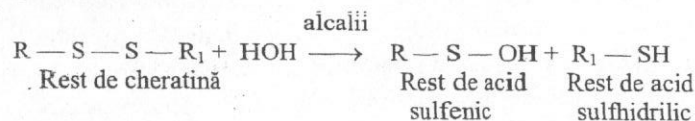
Comportarea keratinelor față de apă, acizi și săruri este, în linii generale, aceeași cu a collagenului. Deosebiri se datoresc structurilor chimice diferite ale celor două proteine fibroase.

14.7.1. ACȚIUNEA ACIZILOR ȘI BAZELOR ASUPRA KERATINELOR

Keratinele sunt rezistente la acizi. Aceasta se explică prin faptul că legătura disulfidică a cistinei, care formează punți transversale între lanțurile polipeptidice ale keratinei, nu se hidrolizează nici chiar la fierberea îndelungată cu soluții diluate de acizi minerali puternici. Acizii tari, în soluții concentrate, rup legătura disulfidică, reacția explicându-se ca având loc prin ionii de sulfoniu:



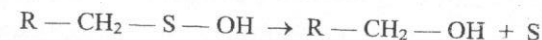
Keratinele sunt mai puțin rezistente la acțiunea alcaliilor, care rup cu ușurință legăturile disulfidice:



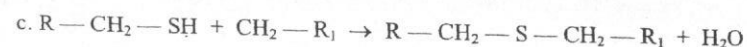
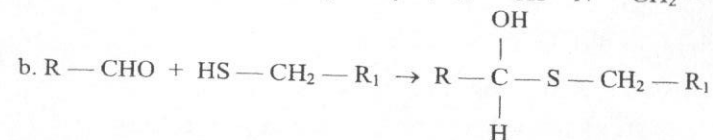
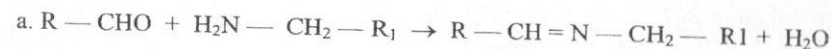
Acizii sulfenici, care se formează, nu sunt rezistenți și se scindează în soluție alcalină:



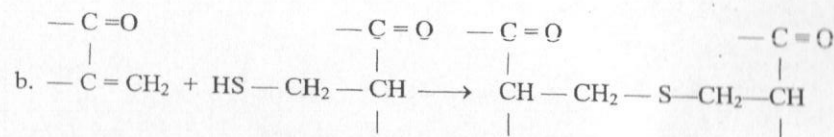
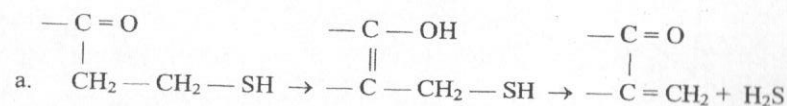
sau



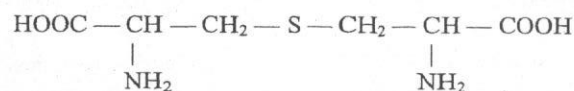
Aldehidele și alcoolii obținuți prin descompunerea acizilor sulfenici se pot combina din nou prin punți de tipul: $-N=CH-$ sau $-CH_2-S-CH_2-$, cu grupele sulfhidrilice și aminice ale catenelor învecinate ale keratinei, după reacțiile:



După unii cercetători, puntea $-CH_2-S-CH_2-$ se poate forma în prezența unor grupe sulfhidrilice, conform reacțiilor:



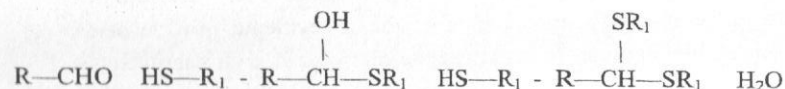
Formarea acestor punți se confirmă prin faptul că, la tratarea keratinei cu alcalii și apoi cu acizi ia naștere lantionina:



Apariția punților de tip lantionină în keratină este favorizată, în mai mare măsură, de către hidroxizii metalelor alcalino-pământoase decât de hidroxidul de sodiu.

La cenușărirea pieilor, după înmuierea cu alcalii, în locul slăbirii legăturii părului, se produce întărirea legăturii acestuia cu pielea. Acest fenomen nedorit slăbește din intensitate dacă în soluția de cenușărire se adaugă amine sau sulfuri. Substanțele menționate blochează grupele aldehydice active formate în proteină.

Tiolii dau reacții de adiție cu compușii carbonilici și analogii lor, formând semimercaptali și mercaptali [218]:

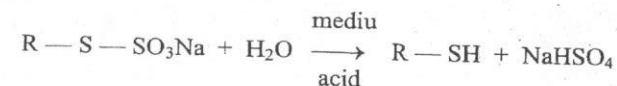


14.7.2. REDUCEREA ȘI OXIDAREA KERATINELOR

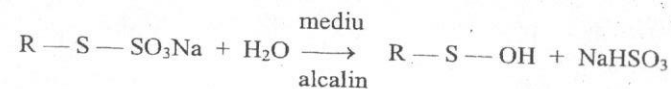
Sub acțiunea substanțelor reducătoare (sulfuri, bisulfizi, hidrosulfizi etc.) se rup punțile disulfidice și se adăunează diferite grupe, în funcție de caracterul substanței reducătoare:

- $\text{R}-\text{S}-\text{S}-\text{R}_1 + \text{Na}_2\text{SO}_3 \rightarrow \text{R}-\text{S}-\text{Na} + \text{R}_1-\text{S}-\text{SO}_3\text{Na}$
- $\text{R}-\text{S}-\text{S}-\text{R}_1 + \text{NaHSO}_3 \rightarrow \text{R}-\text{S}-\text{Na} + \text{R}_1-\text{S}-\text{SO}_3\text{H}$
- $\text{R}-\text{S}-\text{S}-\text{R}_1 + \text{H}_2 \rightarrow \text{R}-\text{SH} + \text{R}_1-\text{SH}$
- $\text{R}-\text{S}-\text{S}-\text{R}_1 + 2\text{Na}_2\text{S} \rightarrow \text{R}-\text{S}-\text{Na} + \text{R}_1-\text{S}-\text{Na} + \text{Na}_2\text{S}_2$

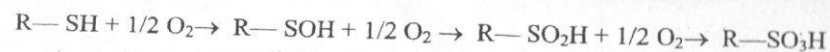
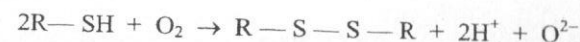
Prin acidularea soluțiilor calde, care conțin produsele rezultate din reacțiile a., b., c., se obține:



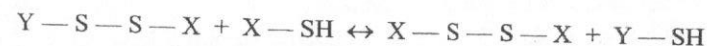
iar prin adăugarea de alcalii, se formează alți compuși:



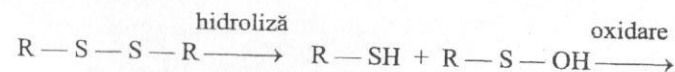
Grupările $-\text{SH}$ sunt deosebit de sensibile la oxidanți și pot fi transformate în disulfuri sau acizi sulfinici și sulfonici, dacă oxidarea este mai energetică:



La oxidarea grupelor $-\text{SH}$ din compușii proteici, prezintă interes și condițiile sterice. Astfel, formarea legăturii $-\text{S}-\text{S}-$ se face cu ușurință când grupările $-\text{SH}$ sunt situate față în față. Grupa $-\text{SH}$ este posibil să treacă în $-\text{S}-\text{S}-$ printr-o reacție de dublu schimb, cu posibilitatea de formare a unor disulfuri mixte [40]:



Acțiunea oxidanților asupra punților disulfidice produce, la început, o hidroliză și apoi oxidarea tioalcoolilor și a acizilor sulfenici:



Acidul tioglicolic și sulfura de sodiu sunt mult mai eficiente în comparație cu sulfitul de sodiu. Se poate utiliza 0,4% acid tioglicolic și 20% hidroxid de sodiu sau 8% hidroxid de sodiu și 3% sulfură de sodiu, care duc la randamente foarte bune de dizolvare și de reprecipitare a keratinelor din păr. Dacă se compară compoziția în aminoacizi a părului și a keratinelor dizolvate și reprecipi-

tate, se constată următoarele: la atacul alcalin, în prezența acidului tioglicolic, precipitatul de keratină fibroasă este mai bogat în histidină, acid asparagic, acid glutamic, leucină și izoleucină, în timp ce proteina de plecare este mai bogată în serină, treonină, cistină și prolină.

În cazul atacului cu hidroxid de sodiu și sulfură de sodiu, se pot face aceleași observații ca mai sus, dar se constată, în plus, formarea a doi derivați noi: lizinoalanina și lantionina.

Pentru a se lărgi aria de utilizare a keratinei, s-au studiat și produs materiale keratinice cu structură poroasă. Se dau mai jos câteva exemple de metode de realizare a unor astfel de structuri poroase:

- Ruperea legăturilor disulfidice din păr sau pene cu agenți reducători, duce la formarea de cisteină cu grupe tiol libere și are loc solubilizarea keratinei. Soluția de keratină este supusă uscării la aer, în prezența oxigenului, când se formează noi legături disulfidice, rezultând o peliculă poroasă mai puțin rezistentă.
- Reducerea keratinei din păr, în soluție de hidroxid de amoniu și tioglicolat de amoniu, la cald, în atmosferă de azot. Urmează o centrifugare, iar supernatantul care conține keratina solubilizată este supus precipitării cu HCl. Suspensia formată este turnată pe o suprafață plană, netedă, într-un strat subțire și uscată la aer. Filmul poros rezultat poate fi folosit ca pansament pentru răni, schelet în ingineria tisulară, membrană de difuzie, înveliș pentru dispozitive implantabile și pentru încapsulare de celule.
- O soluție de keratină se concentrează și se toarnă într-o matriță și se lasă să se usuce la aer. Rezultă un produs cu o grosime variabilă, voluminos, care poate fi folosit ca material implantabil pentru înlocuirea țesuturilor moi sau dure.
- O soluție de keratină se emulsionează și, apoi, prin liofilizare, se obține un material keratinos poros.

*
* *

Lâna. Pe parcursul acestui capitol s-au tratat multe aspecte privind histologia, biochimia și fizico-chimia lânii, în contextul tratării părului cu care are numeroase asemănări, dar și deosebiri.

Lâna este un biomaterial de natură keratinică, care reprezintă o materie primă de bază în toate domeniile textilelor, pentru stoffe, tricouri, țesături pentru mobile, covoare, cuverturi, carpete, tapiserie, fetru, păslă etc.

Avându-se în vedere finețea fibrelor sale, densitatea lor relativ mică și calitatea de bun izolator termic, lâna, se utilizează, în cea mai mare parte pentru produsele textile și foarte puțin pentru alte scopuri. Doar lânii care nu se pretează pentru textile s-a încercat a i se da alte utilizări. Astfel, deșeurile de lâna, aranjate sub formă de baloți și îmbibate cu apă, sunt bătute până se formează o păslă, sub formă de placă, care se utilizează ca izolator termic pentru pereții unor locuințe provizorii.

Termenul de lâna se referă obișnuit la fibrele keratinice ale ovinelor, dar sunt și alte animale cu înveliș keratinic foarte valoros, care se întrebuințează în producția textilă, cum sunt: capra de angora, iepurele albinos, iepurele de angora, capra de cașmir, lama, alpaga, guanaco, capra cashgora, yack etc.

Genul Lama este un termen generic care indică un reprezentant al familiei Camelidae din Anzii Cordilieri din America de Sud. Lama sau lama albă este o camelidă domestică. Termenul de lama este utilizat pentru patru specii apropiate de animale din America de Sud: lama albă, alpaga (domestică), guanaco (sălbatică), vigogne (sălbatică).

Cantitatea de lâna de oaie a principalelor țări producătoare (Australia, China, Noua Zeelandă, Iran, Anglia, Argentina, India, Turcia, Sudan, Africa de Sud, Rusia, Maroc, Spania, Franța, Algeria etc.), după statistici ale FAO, este de 1,8 – 2,0 milioane tone/an.

Lâna este un bun izolator termic, mai ales pentru faptul că reține în structură sa în jur de 80% aer raportat la volum. De asemenea, adsoarbe cu ușurință umiditatea, până la 150 g apă la 1 kg lâna. Este relativ extensibilă și nu reia decât cu dificultate forma originală.

Fibra de lâna este acoperită cu solzi, are un diametru de 20–80 micrometri și

lungimea între 2 și 30 cm, iar pe centimetrul de lungime are 0,2–16 ondulații. Lâna merinos are 8–16 ondulații / cm.

Lâna tratată cu alcalii la pH = 9–10 este susceptibilă a fi hidrolizată sub acțiunea tripsinei și pepsinei.

14. 9. PANA

„Pasărea se recunoaște după penele sale”. Așa începe Alfred Edmund Brehm (1829–1884) caracterizarea generală a acestui grup de vertebrate. Până în prezent, acest caracter care separă grupul păsărilor de cel al rudelor lor – reptilele – rămâne foarte important [41].

În terțiar, a apărut multe specii de păsări care corespund păsărilor de astăzi.

Formarea penajului a ridicat pasărea peste stadiul reptilian. Păsările primare posedau pene foarte diferențiate, ca rezultat a unui proces îndelungat de evoluție. Pana s-a dezvoltat din solzii reptilelor și a evoluat de la *penele de puf* cu o structură simplă, până la *penele de contur*, care reprezintă cele mai complicate și artistice formațiuni cornoase pe care le produce pielea vertebratelor.

Penele de contur, de câteva tipuri, au o structură asemănătoare, dar cu unele deosebiri de formă, corespunzătoare diferitelor funcții. Astfel, sunt penele mari de la aripi (*remigele*) și cele de la coadă (*rectricele*), care au un rol principal în timpul zborului, apoi penele de acoperire (*tectricele*), care feresc corpul păsării de umezeală și de frig.

În figurile 14.21. și 14.22. se prezintă o pană de acoperire și schema construcției unei pene, la care se deosebesc următoarele părți principale: pe axul principal al penei – *rachisul* – sunt dispuse pe ambele părți *steagurile de penaj* (*externe* și *interne*); *calamusul* – este partea rachisului legată de corp, care este gol în interior, străbătut doar de câteva firioare cornoase – *inima penei* – și deschis înspre partea inferioară. Partea superioară a rachisului este umplut cu celule de măduvă pline cu aer servind ramurilor penei (*rami*) drept punct de fixare. Ramurile sunt, la rândul lor, dispuse penat pe ambele părți, formând *paletelile laterale* sau *steagurile*, unul *extern* și altul *intern*, ambele fiind dis-

puse în același plan. Aceste steaguri sunt constituite dintr-un șir de fire mai lungi – *radiile (barbe)* – care, la rândul lor, sunt prevăzute, de o parte și de alta, cu șiruri de fire mai subțiri numite *radiole (barbele)*. Pe radiole se găsesc *cârlige* ale *barbelor* cu care se leagă de barbele învecinate.

La penele tectrice, numai partea superioară formează o membrană continuă, partea inferioară, dinspre corp, este scâmoșată, fiindcă barbele rămân libere. Penele cele mai apropiate de corp au bulbul complet înfundat în piele, rachisul este moale și barbele sunt libere, constituind ceea ce se numește *puful*.

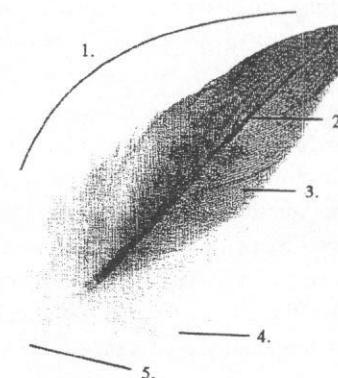


Fig. 14.21. Părțile componente ale unei pene de acoperire.

1. pana, 2. rachis, 3. radii (barbe), 4. radiole (barbele), 5. calamus.

Penele sunt o anexă tegumentară constituită din β -keratine, care se reînnoiesc periodic (năpârlirea), o dată sau de două ori pe an (la păsările migratoare). Cu acest prilej se înlocuiește deseori numai penajul de acoperire (*tectricele*).

Pana, care este un produs al epidermului, este împlântată cu calamusul ei într-o pungă, căptușită de epiderm, împlântată în derm, iar prin papila foliculului pilos comunică cu dermul, la fel ca și în cazul părului.

În calamusul deschis la partea inferioară, pătrund celulele germinative, care devin active din starea lor de latență în care s-au aflat, o dată cu începerea năpârlirii. Din mugurele penal, care se dezvoltă, apare pana nouă, care prin creștere treptată face să cadă pana veche [42].

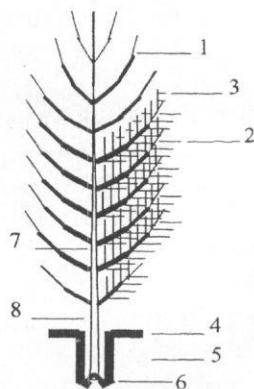


Fig.14.22. Schema construcției unei pene [41].

1. radii (barbe); 2. radiile (barbele); 3. cârligele barbelor; 4. epiderm; 5. derm; 6. folicul; 7. rachis; 8. calamus.

Penajul se referă la dispunerea penelor pe corpul păsării și la colorit. Culoarele penajului variază între specii și subspecii și poate, de asemenea, varia între diferitele grupe de vârste, sex și anotimp [43].

Pigmenții penelor sunt melaninele (negru) și carotinoidele (galben și roșu).

Penele albe sunt lipsite de pigmenți.

Unele culori, zise structurale, nu sunt date de pigmenți. Astfel sunt păsări care au pene verzi și/sau albastre (păunul, papagalul). Culoarele albastre și verzi, se formează datorită unui fenomen optic explicat în cadrul difuziei Rayleigh. Culoarele albastre și verzi, grație efectului Tyndhall se vizualizează pe barbele fără ca acestea să conțină pigmenți. Razele incidente ale barbelor întâlnesc

granule de melanină foarte mici și în concentrație mică, care reflectă undele albastre sau verzi și lasă să se filtreze razele cu lungimi de undă mari.

Combinațiile diferiților pigmenți și aceste fenomene optice permit o foarte mare varietate de culori.

Unicitatea penelor derivă din structurile lor moleculare și morfologice.

Fibrele sunt înalt cristaline, ceea ce le imprimă o rezistență deosebită la solicitările mecanice și termice [44].

Structura penelor, la nivel microscopic, este un amestec complex din fibre drepte și fibre ramificate față de fibra centrală.

Utilizări ale penelor. Cantitatea de pene, pe plan mondial, este de peste 4 milioane de tone anual, din care se utilizează în jur de 20%, iar restul se arde sau se îngroapă.

Penele provin de la sacrificarea păsărilor sau după năpârlire.

Puful se recoltează numai după sacrificarea păsărilor și se utilizează pentru unele articole de îmbrăcăminte caldă și pentru așternuturi de pat (perne, plapumă, saltea, sac de dormit, straturi termoizolante etc.).

Recoltarea penelor după sacrificarea păsărilor se face prin smulgere manuală sau mecanică, dar mult mai ușor, prin încălzirea păsărilor sacrificate la aproximativ 70°C, timp de 1–3 min.

După recoltare, sunt sortate și uscate.

Penele s-au utilizat și se utilizează pentru ornamente, decorații, dar aceasta reprezintă o cantitate infimă din totalul cantității de pene recoltate.

Keratina din pene se utilizează în scopuri medicale, ca supliment alimentar, în cosmetică, la obținerea cisteinei și în multe scopuri tehnice.

Cantitativ, se produce, mai ales, făină ca hrană pentru păsări, și animale mari domestice.

Valoarea proteică a făinilor animale depinde, pe de o parte, de conținutul în proteine și, pe de altă parte, de valoarea biologică a acestor proteine.

Conținutul în proteine este întotdeauna ridicat (tabelele 14.2. și 14.3.).

Tabelul 14.2.

Valoarea proteică medie a făinilor animale (în % a produsului sec)

	%Material	%Lizină ¹	% Metionină ¹
Făină de pene	92,3	2,1	0,6
Făină de oase	45 – 65	5,3	1,4
Făină de sânge	90 – 93	9,1	1,1
Făină de pește	64 – 78	7,6	2,8

(1) În raport cu proteinele brute (Material)

Făina de pene este bogată în proteine dar săracă în cei doi aminoacizi esențiali și de aceea se recomandă a fi folosită în amestec cu alte făine.

Producția de făini animale din Franța, în anul 1997, țară în care există o preocupare mai deosebită în acest domeniu, a fost de 531000 tone, din care 34000 tone făină de pene.

Tabelul 14.3.

Compoziția chimică a făinii de pene

Substanța uscată	Substanța azotată	Lipide	Cenușă	Calciu	Fosfor
93	92	3	3,4	0,2	0,7

Penele, așa cum s-a mai arătat, conțin β -keratină, care este insolubilă în apă, rezistentă la proteaze și are o masă moleculară de aproximativ 10 kDa.

Organizarea moleculară și legăturile sale transversale disulfidice conduc la insolubilitatea lor și la rezistența la cele mai multe enzime proteolitice.

Keratina se poate solubiliza în mediu apos prin ruperea legăturilor sale disulfidice dintre lanțurile polipeptidice.

Ruperea legăturilor disulfidice se realizează prin oxidarea lor cu peracizi

organici, când se formează grupe sulfonice; prin sulfitoliza legăturilor disulfidice cu formare de grupe S-sulfonate; prin reducerea grupelor disulfidice cu compuși tiol ca: 2-mercaptotanol, ditiotritol (D.T.T.) sau ditioeritritol; prin tratarea cu sulfuri metal alcaline, cum este sulfura de sodiu.

Keratina solubilizată din pene cu soluție de Na_2S este tratată cu Na_2SO_3 , după care proteina este precipitată cu acid.

Keratina precipitată este apoi solubilizată în soluție apoasă alcalină și după aceea oxidată folosind apa oxigenată, periodat de sodiu, clorit de sodiu sau un peracid organic, cum ar fi acidul peracetic, care oxidează resturile de cisteină/cisteină, la grupe de acid cisteic. În acest fel, keratinele obținute sunt solubile în apă, complet modificate și mai puțin favorabile în vederea obținerii de filme insolubile în apă.

Keratinele astfel solubilizate pot fi dispersate cu o soluție alcoolică în vederea utilizării la prepararea filmelor și a învelișurilor.

Se pot obține soluții de keratină parțial modificată din pene folosind moniodacetamidă, acid moniodacetic sau acid monobromsuccinic în soluție apoasă concentrată de uree și în prezența 2-mercaptoetanol. Gradul de modificare a keratinelor este de 25–27%, calculat în funcție de grupele $-\text{SH}$ rămase libere.

Cu astfel de soluții se pot obține dispersii stabile și filme cu proprietăți mecanice și termice dorite. Obținerea soluțiilor de keratină parțial modificată utilizând agenți reducători, la pH alcalin, prin modificarea parțială a grupelor $-\text{SH}$, este preferată pornind de la pene, mai ales de pui de găină, de rață, curcan, gâscă.

Materia primă este supusă spălării, sortării, degresării, tăierii, măcinării sau mărunțirii și uscării [45].

Agenții reducători pot fi: sulfuri, tioli, hidrură borică, fosfine sau combinații între ele.

La pH = 9–10, se poate utiliza sulfura de amoniu; din rândul tiolilor sunt preferați: ditiotritol, 2-mercaptoetanol și tioglicolatul; dintre fosfine, este recomandat tri-n-butil-fosfina.

Condițiile de solubilizare: conținutul în keratină a materiei prime, agentul reducător, tamponul, pH-ul, temperatura și durata sunt stabilite în funcție de intensitatea de modificare dorită a keratinei solubilizate. Keratina trecută în soluție, obișnuit, nu se găsește într-o concentrație mai mare de 100g/l; concentrația agentului de reducere în soluția apoasă, de exemplu, sulfură de sodiu sau de amoniu este între 0,05–1,0 M; pH-ul soluției de solubilizare este de 8-9; temperatura de lucru este între 30° și 100°C. În urma solubilizării, este recomandat ca keratina să conțină 20–50% grupe libere –SH [46].

Materiale compozite realizate din keratină din pene de pui și alginat de sodiu, preparate din soluții de alginat-keratină sunt caracterizate prin proprietăți superioare de sorbție, o higroscopicitate mai mare (65%) și un unghi mai mic de umezire decât fibra de alginat (25 deg). Introducerea keratinei în fibrele de alginat coboară proprietățile mecanice ale sale, [47, 48] astfel:

- densitatea liniară de 3–10 d tex;
- alungirea la rupere de la 5% la 16%;
- tenacitatea în stare condiționată de la 7 cN / tex la 15 cN / tex.

Conținutul de keratină din soluția de keratină-alginat, calculat în funcție de cantitatea de azot este între 1,9% și 2,4 %.

Bibliografie

1. Nenițescu C.D., *Chimie organică*, Vol. I și II, Editura Didactică și Pedagogică, București, 1980.
2. Lehninger A.L., *Biochimie*, Vol. I și II, Editura Tehnică, București, 1987, 1992.
3. Chiriță Gh., Chiriță M., *Pielea animală*, Editura Tehnică, București, 1993.
4. Chiriță Gh., Chiriță M., Chiriță A., *Tratat de chimia și tehnologia pieilor și blănurilor*, Vol. I, II, III, Editura Gh. Asachi, Iași, 1999.
5. Grants M.E., Procop D., *J. New Engl. Med.*, 286, 194, 1972.
6. Grassmann W., Engel L., Hanning K., Hormann H., Kühn K., Norwik A., *Progress in the Chemistry of Natural Products*, Vol. 12, Ed. Springer, New York, 1965.

7. Rhodin J.A.C., Reith E.J., *Fundamental of Keratinization*, Publ. Nr. 70, 61, Amer. Ass. Advance Sci., Washington, 1962.
8. Fraser R.D.B., Mac Rae T.P., *Keratins*, Ed Thomas Spriengield, Vol.III, 1972.
9. Elleman T.C., *Biochem.J.*, 128, 833, 1972.
10. Elleman T.C., *Biochem J.*, 147., 3900, 1972.
11. Dopheide T., *Eur. J. Biochem.*, 34, 120, 1973.
12. McLachland A.D., *J. Mol. Biol.*, 124, 297, 1978.
13. Baden H.P., Goldsmith L.A., Fleming B., *Biochem. Biophys. Acta*, 332, 269, 1973.
14. Balmain A., Loheren D., Alonso A., *Dev. Biol.*, 60, 442, 1977.
15. Dale B.A., Holbrook K.A., Steinert P.M., *Nature*, 276, 729, 1978.
16. Dale B.A., Vadlamudi B., De Lap I.W., Bernstein I.A., *Biochem. Biophys. Acta*, 668, 98, 1981.
17. Dale B.A., *Biochem. Biophys. Acta*, 491, 193, 1977.
18. Dale B.A., Thompson W.L., Stern I.B., *Arch. Oral. Biol.* 7, 535, 1982.
19. Dale B.A., Lonsdale-Eccles J.D., Linley A.M., *Arch. Oral. Biol.*, 27, 529, 1982.
20. Lonsdale Eccles J.D., Linley A.M., Dale B.A., *Biochem J.*, 197, 591, 1981.
21. Linley A.M., Dale B.A., *J. Invest. Dermatol.*, 78, 360, 1982.
22. Vgel A.B., Idler W.W., *J. Invest. Dermatol.* 55, 350, 1970.
23. Holbrook K.A., Dale B.A., Brown K.S., *J. Cell. Biol.*, 92, 387, 1982.
24. Lonsdale-Eccles J.D., Haufen J.A., Dale B.A., *J. Biol. Chem.*, 255, 2235, 1980.
25. Lonsdale-Eccles J.D., Teller D.C., Dale B.A., *Biochem.*, 21, 5940, 1982.
26. Dale B.A., Ling S.Y., *Biochemistry*, 18, 276, 1979.
27. Dale B.A., Ling S.Y., *Invest. Dermatol.*, 72, 257, 1979.
28. Scot I.R., Harding C.H., *Biochem. Biophys. Acta*, 669, 65, 1981.
29. Steinert P.M., *Biochem J.*, 149, 39, 1975.
30. Steinert P.M., Cantieri J.S., Teller D.C., Lonsdale-Eccles J.D., Dale B.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 4097, 1981.
31. Mercer D.N., Rogers G.E., Roth S.L., *Nature*, 201, 367, 1964.
32. Matoltsy A. *Nature*, 204, 380, 1965.
33. Crik F.H.C., *Nature*, 170, 882, 1952.
34. Pauling L., Corey R.B., *Nature*, 213, 1123, 1967.
35. Swanbeck G., *Ex. Cell. Res.*, 23, 420, 1961.
36. Astbury W.T., Bele F.O., *Nature*, 167, 1053, 1951.
37. Bragg L., Kendrew J.C., Perutz M.F., *Proc. Roy. Soc.*, 203A, 321, 1950.

38. Pauling L., Corey R.B., Nature, 171, 59, 1953.
39. Pauling L., Corey R.B., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 37, 729, 1951.
40. Oeriu S., Oeriu I., *Grupările tiolice și rolul lor în biologie*, Editura Academiei Române, București, 1977.
41. Das Tierreich nach A.E. Brehm, Urania Verlag, Leipzig, 1961.
42. Humphrey P.S., Parkes K.C., The Auk, 76, 1-31, 1959.
43. Cloé Fraigneau, Les guides du naturaliste, Delachaux et Niestlé, 191, 2007.
44. Schmidt W.F., M.R.S. Symposium Proceedings, Boston, M.A., 702, 25-29, 2001.
45. Schooyen P.M.M., Dijkstra P.J., Oberthur R.C., Bantjes A., J. Agric. Food Chem., vol. 2001, 49, 221-230, 2000.
46. Schooyen P.M.M., Dijkstra P.J., Oberthur R.C., Bantjes A., J. Agric. Food Chem., 16, 4326-4334, 2000.
47. Coulombe P.A., Noew E., Paladini R.D., Wawersik M., Biological Bulletin, 6, 1, 1998.
48. Wrzesniewska-Tosik K., Wawro D., Steplewski W., Szadkowski M., Inst. of Biopolym. and Chemical Fibers, Lodz, Poland.
49. Fraser R.D.B., MacRae T.P., Rogers G.E., *Keratins, their composition, structure and biosynthesis*, Springfield, Thomas, 1972.
50. Fraser R.D.B., Parry D.A.D., Inst.J. Biol. Macro., 19, 207-211, 1996.
51. Cao J.J., Mole. Struct., 607, 69-75, 2002.
52. Singh V., Wang S., Ng K.W., Comprehensive Biomaterials II, Vol. 2, 542-557, 2017.
53. Bomou Ma, XueQiao, XiuliangHou, YiqiYang, *Pure keratin membrane and fibers from chicken feather*, Int.J. of Biological Macromolecules, 89, 614-621, 2016.
54. Cruz F.C., Nuno G., Azoia T., Matamá A., Cavaco P., *Peptide—protein interactions within human hair keratins*, Int.J. of Biological Macromolecules, 101, 805-814, 2017.
55. Shavandi A., Carne A. et al., *An improved method for solubilisation of wool keratin using peracetic acid*, J. of Environmental Chem. Eng., 5, 2, 1977-1984, 2017.
56. Murat K., Xinwei W. et al., *The structure of the "amorphous" matrix of keratins*, J. of Structural Biology, 198, 2, 116-123, 2017.
57. Rajabinejad H., Patrucco A., *Preparation of keratin-based microcapsules for encapsulation of hydrophilic molecules*, Ultrasonics Sonochemistry, 40, A, 527-532, 2018.

58. E., Cruz C.F., *Insights on the mechanical behavior of keratin fibrils*, Int.J. of Biological Macromolecules, 89, 477-483, 2016.
59. Duverger O., Beniash E., Morasso M.I., *Keratins as components of the enamel organic matrix*, Matrix Biology, 52-54, 260-265, 2016.
60. Sharma S., Gupta A. et al., *Characterization of keratin microparticles from feather biomass with potent antioxidant and anticancer activities*, Int.J. of Biological Macromolecules, 104, A, 189-196, 2017.
61. Ju Wang, Shilei Hao et al., *Feather keratin hydrogel for wound repair: Preparation, healing effect and biocompatibility evaluation*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 149, 341-350, 2017.
62. Nafeey S., Ines M., et al., *Branching of keratin intermediate filaments*, Journal of Structural Biology, 194, 3, 415-422, 2016.
63. Xingxing J., Yanfang W., *Extraction, characterization, and no release potential of keratin from human hair*, Materials Letters, 175, 188-190, 2016.
64. Fengrong W., Zieman A., Coulombe P.A., *Skin Keratins*, Methods in Enzymology, 568, 303-350, 2016.
65. Ramirez D.O.S., Carletto R.A., et al., *Wool keratin film plasticized by citric acid for food packaging*, Food Packaging and Shelf Life, 12, 100-106, 2017.
66. Yanfang W., Weiwei Z., et al., *Differences in cytocompatibility between collagen, gelatin and keratin*, Materials Science and Engineering: C, 59, 30-34, 2016.
67. Kelly R., *Keratins in wound healing*, Wound Healing Biomaterials, Vol.2, 353-365, 2016.
68. Bin Wang, WenYang et al., *Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration*, Progress in Materials Science, 76, 229-318, 2016.
69. EsparzaY., Ullah A., Jianping Wu, *Molecular mechanism and characterization of self-assembly of feather keratin gelation*, International Journal of Biological Macromolecules, 107, A, 290-296, 2018.
70. Ramakrishnan N., et al., *Keratin based bioplastic film from chicken feathers and its characterization*, International Journal of Biological Macromolecules, Online 7 Jan. 2018.

CAPITOLUL 15

MĂTASEA DE PĂIANJEN

15.1. Introducere	1227
15.2. Păianjenul	1228
15.3. Firul și pânza de păianjen	1232
15.4. Mătasea de păianjen	1238
15.5. Structura și proprietățile firului de draglină	1242
15.6. Posibilități de utilizare a firelor de mătase de păianjen	1252

<i>Bibliografie</i>	1253
---------------------	------

15.1. INTRODUCERE

Mătasea de păianjen se referă la o gamă largă de filamente continui, cu diametre de 2–200 μm , biosintetizate și filate de specii de lepidoptere și artropode. Mătasea de păianjen probează proprietăți extraordinare de rezistență la tracțiune (mai rezistentă decât oțelul la o aceeași grosime și lungime a firului), mare extensibilitate (asemănătoare cu cea a cauciucului), cu mare capacitate de adsorbției a apei (comparabilă cu a lânii) și biodegradabilitate.

Aceste caracteristici încă nu au fost egale de produsele polimerice realizate de către om, deși procesul biologic de biosinteză se desfășoară la temperaturi și presiuni ambientale și care încă nu a fost elucidat în întregime.

Este un exemplu în care știința și tehnologia, pe considerente biomimetice, trebuie să reușească să imite natura, care în zeci și sute de milioane de ani, a perfecționat prin adaptare și evoluție tot ceea ce ne înconjoară.

În ceea ce privește mătasea de păianjen, în ultimele decenii, oamenii de știință, beneficiind de progresele instrumentațiilor de cercetare cu care sunt dotate laboratoarele, de nivelul general de cunoaștere în domeniul biologiei, geneticii, biochimiei, fizico-chimiei, chimiei, au acumulat cunoaștute deosebit de valoroase privind structura și proprietățile mătăsii de păianjen. De asemenea, au realizat prin biosinteză elemente ale firului de mătase, dar cu proprietăți care încă nu le egalează pe cele ale firului natural. S-au făcut mari progrese asupra posibilităților de aplicare în biomateriale sau pentru ingineria firelor de mătase, care să pună în valoare proprietățile excepționale ale mătăsii naturale de păianjen.

Nu este îndepărtată perspectiva realizării fibrelor de mătase, asemănătoare ca proprietăți cu a celor de păianjen.

Proprietățile principale care trebuie obținute sunt rezistența la tracțiune, elasticitatea și biodegradabilitatea, cu aplicații în medicină (catgut, bandaje, tendoane și ligamente artificiale, suporturi pentru vase de sânge etc.), în tehnica militară (veste antiglonț, căști, întărirea îmbrăcăminte militare), în domeniul aeronautic și aerospațial, pânze pentru vapoare, parașute, material sportiv (patinaj viteză, scrimă, racordaje pentru rachete de tenis, jonglaj etc.) etc.

În prezent, există o fibră sintetică (poliparafenilentereftalamidă) cu o deosebită rezistență la tracțiune și elasticitate, poate chiar puțin superioare firului de mătase de păianjen, cunoscută sub denumirea de Kevlar, brevet din 1965, produsă de firma Du Pont. Întrucât brevetul are termenul expirat a apărut un produs concurent Twaron fabricat de Teijin [1-4].

15.2. PĂIANJENUL

Păianjenul, în ordine ierarhică, face parte din diviziunea *Metazoa*, subdiviziunea *Bilateralis*, încrengătura *Artropoda*, subîncrengătura *Chelicerata*, clasa *Arachnida*, ordinul *Aranea*.

Se apreciază că trăiesc circa 44000 specii de aranee [47]. Unele specii trăiesc 6-8 luni și mor după depunerea ouălor, altele trăiesc 1-2 ani și mor după ieșirea puilor din ouă și sunt specii de păianjeni care au o durată de viață de până la 7-8 ani.

Ca la toate artropodele, creșterea are loc prin schimbarea succesivă a exoscheletului. În funcție de specie, au loc 8-13 schimbări pentru a se ajunge la stadiul de adult. Morfologia externă a acestor animale este formată din patru perechi de picioare, cefalotorace și abdomen (Fig.15.1. și 15.2.).

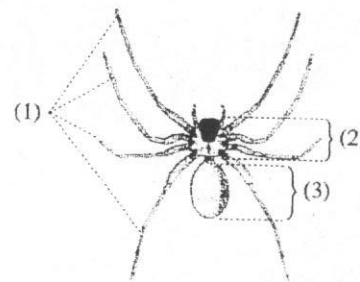


Fig.15.1. Anatomia păianjenului. 1 - patru perechi de picioare, 2 - cefalotoracele, 3 - abdomenul.



Fig.15.2. *Aculepeira ceropegia* (ordinul *Arachneae*).

Aculepeira ceropegia este răspândit în Europa, are forma mingii de rugby, masculii au mărimea de 7mm, iar femelele de 15-17 mm.

Păianjenii s-au adaptat aproape în toate mediile, de la mediul arctic la ecuator, cu excepția apelor sărate, a altitudinilor foarte înalte și a mediilor foarte

reci. Conformația generală a corpului este adaptată la mediu. De exemplu, păianjenii care trăiesc în locurile umede au corpul mai voluminos, picioarele scurte și groase, cu cefalotoracele mult bombat și înclinat anterior, cu vederea mai slabă. Cei care trăiesc în terenuri uscate au o cuticulă tare și cu spini pentru ai feri de uscăciune, picioarele lungi și subțiri, ochii sunt mult mai mari, cu posibilități de vedere la distanță.

Pe partea superioară a cefalotoracelui se află ochii simpli, în cele mai multe cazuri, în număr de opt. Numărul, poziția, mărimea și direcția lor formează semne distinctive pentru diversele familii.

Chelicerele constau dintr-un articol bazal, puternic, având pe partea interioară un șanț și un articol terminal în formă de ghiară. Acest articol este perforat terminându-se, ca și dintele cu venin al șarpelui, cu o glandă veninoasă.

Pielea omului poate să fie străpunsă de mușcăturile unui număr redus de păianjeni, iar cantitățile de venin de care dispun sunt suficiente pentru uciderea animalelor ce formează prada păianjenilor și sunt, de obicei, prea mici ca să devină periculoase pentru om.

În România, numai *Chiracanthus punctorium*, un păianjen verde de pajști, a cărui pânză deasă se poate vedea adesea pe spicele de graminee, este în stare, prin mușcătura sa, să producă omului o intoxicație mai puternică.

Toate speciile de păianjeni cunoscute sunt prădători și se hrănesc exclusiv cu pradă vie.

Ca toate *Arachnidele*, păianjenii nu absorb decât lichide; deci trebuie să lichefieze prada înainte de a o putea ingera. De aceea, în plaga produsă pe corpul prăzii în urma mușcăturii, păianjenul inoculează fluide digestive care declanșează procese de hidroliză și apoi suge amestecul lichid format.

În calitate de prădători, păianjenii joacă un rol însemnat în reglarea populațiilor de insecte. Și ei la rândul lor sunt vânați de reptile, păsări sau unele insecte din familia *Pompilidea* (*Himenoptera Apocrites* a super familiei *Vespoidea*).

În afară de păianjenii care aparțin familiilor *Uloboridae* și *Holarchaeidae* și a grupeii de *Mesothelae*, toți păianjenii pot inocula un venin pentru a se pro-

teja sau pentru a-și omori prada.

Mușcăturile speciilor mai mari sunt foarte dureroase, dar nu lasă sechele. Numai 200 de specii cunoscute dau pișcături care pot pune probleme sănătății omului [6].

Unii păianjeni sunt foarte periculoși pentru om, așa cum este *Migala americană* care trăiește, mai ales, în Brazilia. Are până la 30 cm lungime, iar firele de mătase din pânza sa sunt foarte rezistente la rupere și extensibile.

Migala australiană (genul *Phormictopus*) are un venin foarte otrăvitor care poate provoca moartea omului. Poate ataca o pradă cu o greutate de circa 700 de ori greutatea sa și face o pânză foarte întinsă din fire de mătase cu o bună rezistență și elasticitate.

În regiunile mediteraniene sunt mai multe specii de păianjeni veninoși.

Lycosa tarentula este cunoscut în sudul Italiei, lung de 4 cm, cu patru ochi mai mari și alți numeroși ochi mai mici.

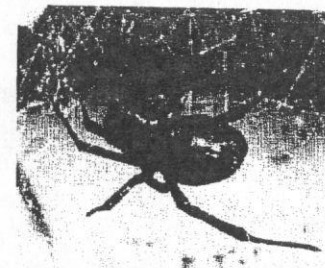


Fig.15.3. Văduva neagră, (*Latrodectus mactans*, Familia Theridiidae), are venin periculos pentru om, produce o mătase (draglina) cu caracteristici mecanice deosebite, cercetată la Universitatea din California.

Păianjenii, numiți în sudul Franței *malmignatte*, întâlniți și în jurul Mării Negre, numiți *karacurt*, aparțin genului *Latrodectus*, sunt păianjeni mici, până la un centimetru, cu corpul negru. Cei din specia *Latrodectus tredecimguttatus* prezintă 13 pete roșii.

Văduva neagră (*Latrodectus mactans*) (Fig.15.3.) se găsește peste tot continentul american, în regiunile calde, temperate sau reci, uscate sau umede, în

orașe și sate și până la 3500m altitudine. Cu toate că nu este agresiv, este păianjenul apreciat a fi cel mai periculos din lume, din cauza veninului său. Este foarte numeros în orașele Guadalajara și Aguascalientes. Subspecia europeană *Latrodectus mactans tredeciguttatus* este prezentă în jurul Mediteranei, în Corsica, din Arabia, până în Caucaz.

Văduva neagră este o specie de talie mică (15mm lungimea corpului), neagră, iar la femele, prezintă pe abdomen are o pată roșie în formă de clepsidră. Partea bărbătească are 7-9mm lungime și este mai puțin colorată. Denumirea populară de Văduva neagră este atribuită pentru faptul că, după împerechere, femela mănâncă masculul. Veninul speciei *Latrodectus* (α -latrotoxina) este de 15 ori mai puternic decât veninul șarpelui cu clopoței, distruge veziculele sinaptice și are o acțiune neurotoxică mai puternică decât a veninului de cobră. Din fericire, cantitatea de otrăvă injectată în cazul mușcăturii, pentru om este prea mică să ca fie mortală. Principalele simptome sunt tulburările neurovegetative, cefaleea, spasme musculare, tulburări psihice.

Atrax robustus din Australia și Noua Zeelandă sunt, de asemenea, păianjeni periculoși pentru om. Acești păianjeni sunt mai mult sedentari, stau sub pietre sau în tufișurile din regiunea de stepă și atacă vitele, cămilele și oamenii. Cazurile mortale sunt foarte rare și se produc, mai ales, în rândul copiilor și a persoanelor în vârstă.

Păianjenul *Avicularia avicularia*, lung de 8-8,5cm, cu corpul abundent păros, trăiește în regiunile tropicale ale Americii Centrale și de Sud și în India, se hrănește cu insecte mari, nevertebrate mici și, uneori, cu păsări.

15. 3. FIRUL ȘI PÂNZA DE PĂIANJEN

Activitatea păianjenilor producători de fibre este unul dintre elementele cele mai caracteristice din viața acestora.

Păianjenii au evoluat și s-au specializat în a produce diferite tipuri de fibre necesare îndeplinirii unor funcții specifice: prinderea prăzii (trape sau pânze), imobilizarea și conservarea prăzii, fire de securitate pentru a scăpa de prădători (draglină = dragline engl.), structuri de transport, rezerve de aer, cuiburi, saci pentru ouă, adezivi, etc.

Din cele 44000 de specii de păianjeni, cunoscute, aproximativ jumătate folosesc plase, diferite ca design, pentru prinderea prăzii, utilizând 5-10 tipuri de glande sericigene.

Mai mult studiate au fost *Nephila clavipes* și *Araneus diadematus*, care produc tipuri diferite de mătase utilizate în construcții cu funcționalitate specifică [47].

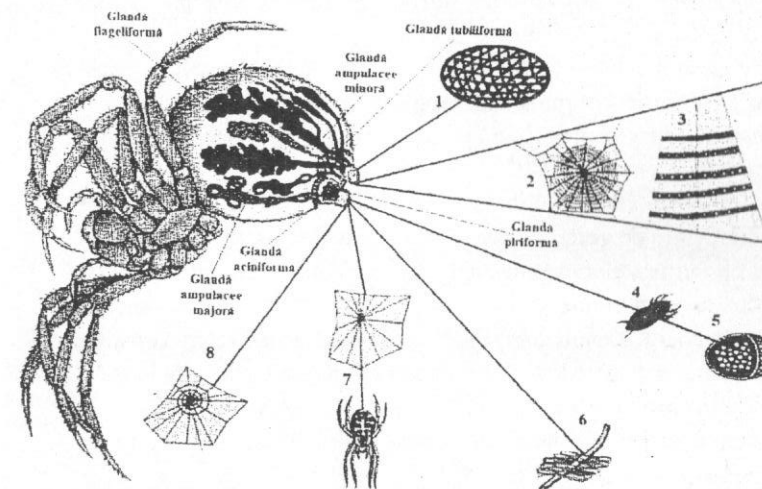


Fig.15.4. Glande sericigene și fire de mătase produse de *Araneus diadematus*
1 – sac pentru ouă (cocon); 2 – fire cilindrice pentru captură; 3 – secvențe adezive; 4 – fire pentru imobilizarea prăzii; 5 – fire pentru împachetarea prăzii; 6 – microfibre pentru cimentare/hidrofobizare; 7 – fire de mătase draglină; 8 – fire auxiliare pentru structura spiralată [48, 55].

Glandele sericigene sintetizează și stochează mătasea în stare lichidă și se deschid prin așa-numitele papile filiere, papile intero-anterioare și papile exteroposterioare.

Biosinteza are loc la temperatura ambientală iar solventul este apa.

Pentru obținerea unui filament colaborează trei perechi de filiere (de exemplu, anterior laterală, posterior mediană, posterior laterală).

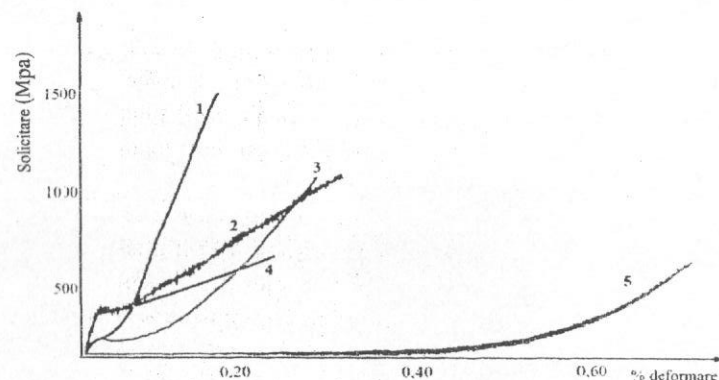


Fig. 15.5. Diagrama solicitare/deformare pentru diferitele tipuri de mătase după glanda de proveniență. 1 – ampulacee majoră (draglina); 2 – aciniformă; 3 – ampulacee minoră; 4 – tubuliformă; 5 – flageliformă [55].

La *Lifistiidae*, se observă tendința ca papilele intero-anterioare să se contopescă între ele, iar printre *Labidognatae* acestea s-au păstrat, la unele familii, sub forma unei plăci mici, centrale, de chitină, care posedă două câmpuri minuscule cu pori (*cribelium*). Este vorba de orificiile de ieșire a substanței care produce fibrile lipicioase.

Păianjenii care posedă un asemenea organ se reunesc sub denumirea de *Cribellatae*. Aceștia posedă, pe penultimul element al ultimei perechi de picioare, un pieptene, numit *calamistrum*, format din peri încovoiați, cu care scot firele lipicioase din *cribelium* [7].

Privit la microscop, un fir este constituit din două fire axiale puternice, care provin din papilele filiere posterioare și sunt acoperite cu substanță adezivă. Pe firele axiale, se observă perechi de firioare foarte fine, puternic răsucite, care provin din *cribelium*. Acestea împiedică formarea substanței lipicioase în picături, cum se observă la firele de prindere prin aderență ale unor păianjeni (*Ecribellatae*) (Fig. 15.6.).

Firele de păianjen folosesc și la formarea unui cocon pentru ouă. Sub protecția coconului, se maturează oăle și tot aici stau câțva timp și păianjenii tineri după ieșirea din ouă. Sunt cunoscuți coconii rotunzi, pe care încă din luna mai, femelele păianlenilor-lupi (*Lycosa*) îi târăsc după ele pe solul pădurii.

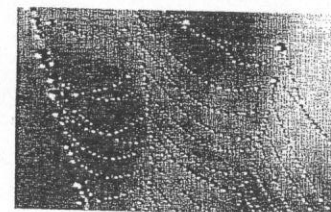


Fig. 15.6. Parte din pânza de păianjen cu picături de adeziv

Coconul cu picior al genului *Agroteca* are, la formarea sa, aspectul unei cupe de vin atârnată cu gura în jos, la jumătate de metru de pământ, care până a doua zi, este mascată ca un bulgăre de pământ, deoarece în timpul nopții femela-mamă transportă neîncetat bucățele de pământ pe care le așează pe cupa din fire de mătase. Coconul conține o cameră superioară pentru ouă și o cameră inferioară ce servește progeniturilor drept locuință. Coconii păianjenului-viespe (*Argiope bruennichi*) au aspect de baloane acoperite la exterior cu o pânză ca foaia de hârtie.

Dacă păianjenul vrea să facă o punte peste un spațiu, produce un fir pe care îl lasă liber de un capăt să fluture în vânt, până se prinde de o ramură de copac sau altceva și apoi se poate deplasa pe el. Păianjenul tânăr părăsește coconul, se urcă în punctul cel mai ridicat al locului său de așezare și începe să producă un fir, care, dacă a ajuns la o anumită lungime, este luat de vânt cu tot cu păianjen și dus până se prinde undeva, astfel, se face strămutarea păianjenului și unde, probabil, își va duce viața pe mai departe. Pentru a nu fi condamnat la o călătorie perpetuă, și pentru a se reîntoarce pe pământ, în aer, răsuște cu picioarele firul sub forma unui ghemotoc alb și în felul acesta vine, încet, jos.

La specia *Atypus affinis*, genul *Atypus*, care trăiește obișnuit în pădurile de pini, masculii au lungimea de 7mm iar femelele de 1-1,5mm, construiesc în

solul pădurii o locuință în forma unui canal, care poate să ajungă până la 0,5m lungime. La suprafața pământului, este prelungită cu un canal de ieșire lung de 6-12cm. Dacă peste acest canal trece o insectă sau un miriapod, atunci păianjenul îi înfige imediat în corp, prin peretele de mătase al canalului, ghearele chelicerelor cu venin, apoi apucă victima și o consumă.

Păianjenul-de-apă (*Argyroneta aquatica*) își face sub apă, din fire de mătase, un adevărat clopot de scafandru, pe care îl umple cu aer, de aici pornește la vânătoare. Sub clopot puii de păianjen își petrec prima perioadă din viață.

La cea mai înaltă perfecțiune au ajuns păianjenii care capturează prada cu ajutorul pânzelor (plaseelor). Constructorii de pânze în formă de spirală circulară se pot vedea în grădini, câmpii și păduri. Pânza este geometrică, cu partea centrală închisă, adesea cu o retragere (Fig.15.7.).

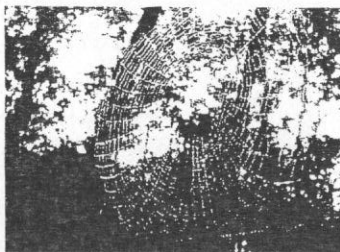


Fig.15.7. Pânză de *Nephila Madagascariensis* cu diametrul de până la 2m. Se pot prinde păsări mici și lilieci, iar păianjenii sunt cunoscuți în literatură sub denumirea de „Orb-weaver spiders”.

Păianjenul care construiește o astfel de pânză este și *Nephila clavipes*, iar fibra de mătase pe care o produce a fost mult studiată și asupra căreia vom reveni (Fig.15.8.).

Păianjenii constructori de pânze fac parte din mii de specii, dar cercetătorii au studiat modul de producere a fibrelor de mătase de către păianjenii unor specii, ale căror fibre s-au dovedit a avea caracteristici mecanice deosebite, în scopul producerii lor pe cale de biosinteză sau sinteză, pentru a fi utilizate în scopuri practice. Astfel, se menționează păianjenul care produce plasa sub for-

mă de roată (*Argiopidae*), păianjenul-cu-cruce (*Aranea diadematus*), păianjenul-viespe (*Argiope bruennichii*), precum și păianjenii cu patru maxilare (*Tetragnathidae*), printre care se numără păianjenii-țesători cu pânză întinsă (*Tetragnatha*).



Fig.15.8. *Nephila clavipes*

Dacă se privește cu atenție o pânză, se observă că este înconjurată cu fire marginale în formă de cerc, la care, în funcție de specie, înaintează prin centru 10-30 de fire ca diametre. Centrul, sau bucșa roșii, constituie la multe specii locul de fixare a păianjenului.

La alte specii, la care păianjenul stă la periferia pânzei, produce de la centru un fir „de semnalizare” până la ascunzișul său. Puțin mai departe de centru, începe spirala regulată a firelor de prehensie, care la *Ecribellatae* sunt acoperite cu picături lipicioase.

Păianjenii sferici (*Theridiidae*) își construiesc o plasă de vânătoare sub formă de acoperiș, de la care atârnă o mulțime de fire de prehensie prevăzute cu picături de lipici, care sunt foarte slab fixate de pământ. Un animal-victimă care fuge pe pământ și se lipește de un fir, este tras în sus de păianjen care îl fixează apoi de acoperiș.

Foarte variată este comportarea păianjenilor cu ocazia împerecherii. În cele mai multe cazuri, masculul este mai mic de statură față de femela mult mai voluminoasă. Imediat după împerechere, femela flămândă omoară și mâ-

năncă masculul. De aceea, la unele specii masculul imobilizează femela înainte de împerechere. La păianjenii-de-apă, la care masculul este mai mare decât femela, ambele sexe trăiesc în convețuire pașnică.

15.4. MĂTASEA DE PĂIANJEN

Rezistența, soliditatea și elasticitatea mătăsii de păianjen continuă să intrige pe oamenii de știință, care sunt surprinși de faptul că acest material este mai fin decât părul uman, mai ușor decât bumbacul și mai tare decât oțelul la o aceeași grosime. Pânza de păianjen a fost și este utilizată în unele părți ale lumii pentru a ușura cicatrizarea rănilor.

Au fost izolate genele care controlează biosinteza firului de mătase și s-a experimentat introducerea lor, prin transgeneză, în genomul altor specii, pentru a realiza un organism genetic modificat (OGM), capabil să producă un fir solid, cu aceleași proprietăți mecanice ca firul de mătase de păianjen.

În glande, mătasea este lichidă, cu masa moleculară de circa 30000 și se solidifică, sub formă de fibrile, odată ieșită din filiere, sub efectul tracțiunii executate de picioarele animalului.

Firul de mătase este constituit dintr-o împletire a unui număr de fibrili elementari, cu un diametru de $0,05\mu\text{m}$ fiecare. Diametrul firului de mătase variază între 25 și $70\mu\text{m}$.

Glandele pentru mătase ale păianjenului pot ocupa o porțiune importantă din abdomen (Fig.15.4.), în special la speciile care construiesc plasă. S-au identificat la păianjeni până la zece tipuri de glande pentru mătase și filierele acestora, fiecare producând mătase cu diferite proprietăți și utilizări.

În continuarea glandelor sericigene se găsesc tubuli extractori, care sunt parcurși de soluțiile de mătase (amestecuri de spidroine și alte componente), în drumul lor către filiere (protuberanțe articulate, $0,05\mu\text{m}$ în diametru), în număr variabil în funcție de specie, situate în partea ventrală, mai mult sau mai puțin, spre extremitatea abdomenului. (Fig.15.9.).

Spidroinele sintetizate de glandele ampulacee majore sunt stocate în lumenul acestor glande, în prezența ionilor de sodiu și clor, care mențin ames-

tecul fluid, iar, în timpul filării, acești ioni sunt schimbați cu ioni de potasiu și ioni fosfat [61]. Mecanismul nu este elucidat în totalitate.

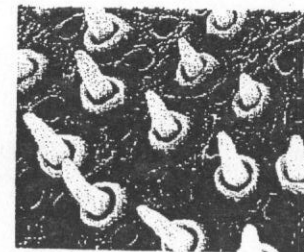


Fig.15.9. Filiere de pe abdomenul păianjenului

Tubulii extractori sunt responsabili pentru mecanismele de solidificare a mătăsii de păianjen (Fig.15.10) [53, 55, 59, 60].

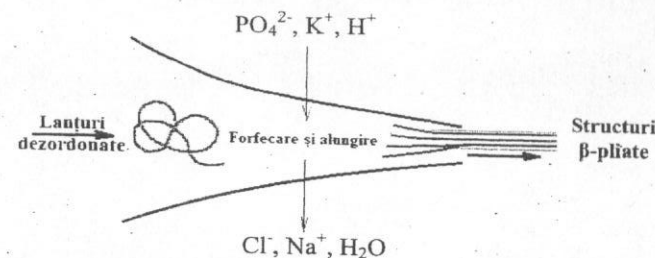


Fig.15.10. Rolul sărurilor în formarea structurilor β -pliate antiparalele [48].

Pereții tubulilor glandelor ampulacee majore conțin un număr mare de pompe Na^+ / K^+ care fac posibil schimbul intens de ioni [59].

Studiile au arătat că în lumen, în prezența NaCl , gradul de agregare al spidroinelor stocate este scăzut ($\leq 20\%$), comparativ cu gradul de agregare al spidroinelor în prezența Na_3PO_4 ($\leq 100\%$) din tubulii spre filiere.

Sulfatul de sodiu prezintă, în aceste condiții, un caracter cosmotropic accentuat.

Amestecul fluid din glandele sericigene se comportă ne-newtonian și, de aceea, sub acțiunea de tragere a picioarelor păianjenului, lanțurile macromoleculare se întind în paralel și se interconectează prin multe legături de hidrogen, formând structuri supramoleculare (structura secundară).

Deși mătasea este produsă în glandă sub formă lichidă, ea apare din filieră ca o fibră solidă.

Diferite părți ale glandei secretă diferite tipuri de proteine (spidroine), în cavitatea glandei, care formează un miez al viitorului fir, un strat median și altul de acoperire (Fig.15.11.).

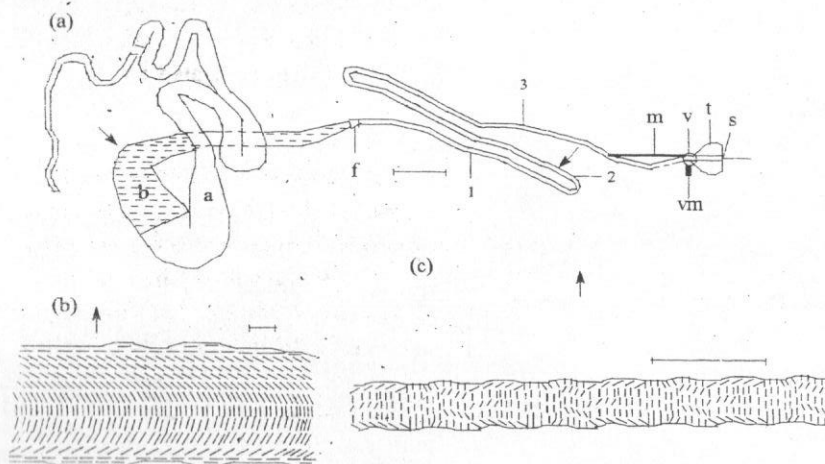


Fig.15.11. Anatomia celei mai mari glande de la *Nephila edulis* și schița obținută prin polarizare microscopică, care arată orientarea moleculară în rezervorul de alimentare, *in situ*, în două locații din glandă. Viteza de curgere a lichidului vâscos cu fragmente proteice este mai mică la mijlocul tubului și din ce în ce mai mare în spre pereții tubului. Zona a; zona b; f - pâlnie; 1,2,3 - ramuri de tub; m - mușchi de ridicare a tubului; v - valvă; vm - valvă tensor (mușchi care se întinde sau se încordează); s - cep (spigot); scara (a) 100 μ m; scara (b) 1 mm; scara (c) 100 μ m. [42].

De exemplu: discul de fixare (prinde, fixează pe suporturi firele cadru și radiale ale pânzei); firele puternice, rezistente de mătase „dragline line” (safety line - fir de siguranță, de protecție) din care se construiește cadrul exterior și firele radiale ale pânzei; fire în spirală pentru pânza sferică (orb web) (Fig.15.7.); mătase lipicioasă pentru captură (Fig.15.6.); mătase pentru înfășurarea prăzii; sac de mătase pentru protecția ouălor; mătase pentru alcătuirea unei îngrădiri solide în jurul sacului cu ouă (Fig.15.4.).

Mătasea, foarte vâscoasă, se scurge ca un lichid ne-newtonian prin tubul îngust al glandei, unde celulele care căptușesc tubul extrag apa din acest fluid biocompozit. Apoi i se modifică și pH-ul de la 6,9, care este pH-ul fiziologic, la 6,3 care, probabil, este pH-ul izoelectric al proteinelor viitorului fir de mătase.

Este știut că la pH-ul izoelectric, proteinele au o solubilitate minimă. Secțiunea finală a tubului conține un înveliș gras prin care trece firul de mătase. În final, crește forța de tragere, proces care ajută la convertirea substanței lichide foarte vâscoase în fibră solidă [41, 45].

S-a observat, de asemenea, și existența, la unele specii de tarantule, a unor minifiliere secretoare de fire de „salvare”, poziționate în partea terminală a picioarelor, care secretă cantități mici de proteină în situații de maximă urgență (Fig.15.12.).

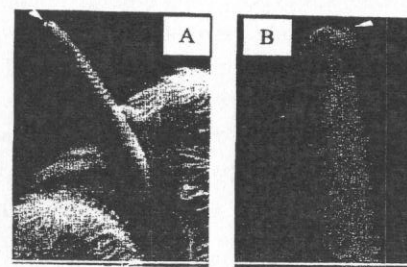


Fig.15.12. Microfilieri de pe picioarele păianjenului (A - 5 μ m, B - 2 μ m) [51, 52].

Glandele păianjenilor nu se golesc niciodată.

S-a constatat că pot produce continuu aproximativ 300-600 m de fir foarte

rezistent. S-a calculat că un fir s-ar rupe, sub greutatea proprie, la o lungime de 8-10 Km.

15.5. STRUCTURA ȘI PROPRIETĂȚILE FIRULUI DE DRAGLINĂ

Mătasea de păianjen s-a dovedit a fi mult mai rezistentă decât mătasea de *Bombyx Mori*.

Această caracteristică diferențiază cele două tipuri de mătase naturală și principala cauză o constituie funcția lor naturală de întrebuințare. În timp ce, viermele de mătase folosește aceste fibre pentru a forma coconi, în timpul metamorfozei, păianjenii au nevoie de elemente de construcție, solide și complexe, pentru a-și prinde prada [51].

Dintre numeroșii păianjeni care secretă fire de mătase de diferite calități, atenția cercetătorilor a fost atrasă, printre altele, de mătasea păianjenului „golden orb-weaving” *Nephila clavipes*, care are o rezistență la tracțiune și o extensibilitate excepționale. Firul de mătase al *Nephilei clavipes* este dur, extensibil și mult mai impermeabil la apă decât firele de viermi de mătase folosite în industria textilă.

Cercetările s-au îndreptat spre a se stabili mecanismul biochimic de formare a firului din glanda păianjenului, structura moleculară a fibrei, separarea genelor proteinelor mătăsii, pentru a se putea realiza o mătasă artificială cu proprietăți asemănătoare.

În ceea ce privește compoziția în aminoacizi, în proteinele fibrei de mătase se găsesc șapte aminoacizi, din care doi sunt majoritari: alanina și glicina și cinci sunt în cantități mici: glutamina, leucina, arginina, tirozina și serina, iar după unii cercetători și prolina.

Jelinski și colab. au folosit rezonanța magnetică nucleară (RMN) pentru a constata cum sunt așezate, în general, componentele principale ale fibrelor de mătase de păianjen. Fibra este constituită din două proteine bogate în alanină, cuprinse într-un polimer gelatinos.

Jelinski și colab. găsesc că structura de lanț a uneia dintre proteine este foarte ordonată (zonă cristalină) și structura celeilalte este mai puțin ordonată (zonă amorfă). Aceste proteine aderă la un polimer bogat în glicină, care re-

prezintă aproximativ 70% din material. Bazându-se pe studiile RMN, Jelinski susține că rezistența și elasticitatea mătăsii draglină derivă din îmbinarea componentelor ordonate și dezordonate. Polimerul amorf al mătăsii seamănă cu „un amestec de spaghetti pregătit la bucătărie” care dă fibrelor elasticitate, în timp ce cele două tipuri de proteine dau rezistență, soliditate, tenacitate.

Pentru mătasea de păianjen, cercetătorii cred că au identificat întreaga secvență genetică, care măsoară mai mult de 22000 perechi de baze, părere care trebuie încă verificată [8].

Randolph V. Lewis a identificat genele pentru cele două proteine principale din draglină sunt spidroina de tip1 și spidroina de tip2. Colectivul său a clonat loturi din aceste gene pe care le-a implantat în bacteria *Escherichia coli* pentru a se produce proteina mătăsii în soluție, din care să obțină apoi firul de mătase. Folosind tehnici similare cu ale lui Lewis, și colectivul lui David L. Kaplan a încercat să obțină fire de mătase.

S-a arătat mai sus că multe specii de păianjeni produc peste opt feluri de mătase pentru diferite scopuri și cu diferite rezistențe și elasticități. Femelele păianjenilor constructori de plase pot produce până la șase fibre diferite, plus o mătase adezivă. Cele mai importante sunt cele sintetizate de glanele ampulacee majore (scheletul principal al plasei) și cele provenite din glandele flage-liforme (firele de captură dispuse în spirală).

Proprietățile firelor de mătase sunt expresia diferitelor gene din diferitele glande (Fig.15.5.). Pe baza acestor constatări, colectivul Gosline a transplatat patru gene de la *Nephila clavipes* la alt păianjen, *Araneus diadematus*, și acesta a produs fire cu caracteristici deosebite [9].

Deși natura și industria sunt capabile de a produce polimeri de înaltă performanță, natura a dezvoltat metode superioare pentru procesarea biopolimerilor în materiale. Aceste metode permit utilizarea aproape optimă a proprietăților mecanice ale lanțurilor de polimeri, prin utilizarea unor condiții de procesare, chimice și fizice, mai simple și mai blânde.

Materialele de origine biologică probează avantaje importante privind compatibilitatea intrinsecă cu sistemele biologice și cu biodegradabilitatea sau cu bioresorbția. Un exemplu este fibra de mătase de păianjen care, reprodusă

în laborator, cu consumuri mai mari de energie, nu poate egala încă proprietățile fibrei naturale [10, 51].

Spidroinele, cu o masă moleculară de 250-300 kDa, sintetizate de glandele ampulacee majore, reprezintă componentele polipeptidice majoritare din fibra de mătase a păianjenului *Nephila clavipes*.

Filamentele de spidroină au diametre de 1-20 μm. Privite în secțiune transversală, acestea prezintă un miez conținând nanocristale anizotropice proteice β-pliate antiparalele, dispuse într-o matrice amorfă (Fig.15.13.) [47]. Învelișul cuprinde trei straturi, diferite compozițional, dinspre interior spre exterior, în ordinea:

1. mătase a glandelor ampulacee minore,
2. glicoproteine,
3. lipide.

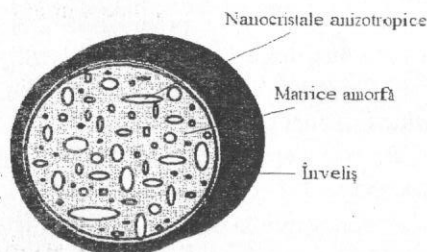


Fig.15.13. Reprezentare schematică a structurii unei fibre de mătase de păianjen.

În studiul lui Gosline și colab., cu privire la microstructura mătăsii draglină, se arată că fibra este un microcompozit al micului cristalit anizotrop, al lanțului-β, introdus într-o matrice de polipeptide amorfă, elastice. Domeniul cristalin se presupune a avea aproximativ 30% din volumul mătăsii uscate, iar restul este ocupat de segmente de peptide cu aproximativ 15 aminoacizi, care sunt sticloase, când sunt uscate, și cauciucoase când sunt umflate în apă distilată [9,15]. Moleculele lungi de spidroină trebuie să se extindă prin numeroase cristallite și se interconectează prin regiunile amorfă prin legături de hidrogen.

Spidroinele glandelor ampulacee majore de *Nephila clavipes* sunt reprezentate, în principal, de spidroina de tip 1 (MaSp1) și de tip 2 (MaSp2). Acestea sunt alcătuite majoritar din glicină, alanină și prolină. Structura lor primară constă în secvențe repetative de bloc-copolimeri de poli(Ala), poli(Gly-Ala), (Gly-Gly-X)_n sau (GPGXX), unde X poate fi leucină, tirozină sau gluatamină [47].

Regiunile bogate în alanină sau/și glicină-alanină formează structuri de foi pliate β și sunt responsabile pentru rezistența mare la tracțiune a fibrelor; blocurile de (Gly-Gly-Ala) formează 31 de structuri helicoidale, care, plasate între lanțurile β ridige, conferă proprietățile elastice și de flexibilitate.

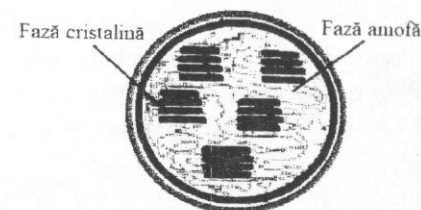


Fig.15.14. Dispunerea componentelor cristaline și amorfă în fibrilele de mătase de păianjen

Stabilirea secvenței aminoacizilor a lanțurilor polipeptidice proteice ale mătăsii [11, 54] a permis cunoașterea structurii moleculare, iar clonarea [10-14] a condus la obținerea unei cantități mai mari de fibre de draglină pentru studiile de laborator.

Xu și colab. [11] au găsit că secvența aminoacizilor este total diferită de a mătăsii de viermi de mătase (*Bombyx mori*).

Moleculele din ambele tipuri de mătase constau din secvențe alternative, probabil, în formă de lanțuri-β și segmente care rămân răsucite întâmplător sau formează structuri α-helix; totuși, lungimea acestor segmente este mult mai mare în mătasea viermilor de mătase.

Mătasea de păianjen, este mult mai puțin regulată în secvențe decât mătasea viermilor de mătase, fapt care poate explica de ce mătasea de păianjen filată conține o mare proporție de material amorf.

În mătasea de draglină se repetă secvențe de câte 34 de aminoacizi, care includ regiuni bogate în alanină și corespund regiunilor amorse, așa cum sugerează Gösline [11].

Înainte de toarcere, moleculele de spidroină sau de fibroină, sintetizate de păianjen sau de viermele de mătase, sunt solubile în apă, formând un fluid newtonian cu peste 25%, în greutate, substanță uscată [16,17]. Este de presupus a avea în structură o cantitate mică de α -helixuri, o vâscozitate moderată și poate fi ușor manipulată și depozitată la temperatura camerei.

În timp ce mătasea de draglină conține lanțuri cu domenii β și spirale întâmplătoare [9], fibrele de viermi de mătase sunt aproape toate lanțuri- β [17].

Regiunile β din mătasea de draglină sunt rigide și inextensibile.

Structura internă a firului de mătase de draglină a fost pusă în evidență cu ajutorul microscopiei de forță atomică [18].

S-a utilizat în studiu structura tridimensională la scară nanometrică a mătăsii de draglină de *Nephila clavipes*, folosind secțiuni micrototate ale mătăsii. Contrar cu modul propus, mai înainte, de distribuire întâmplătoare a cristalitelor proteice amestecate în regiunile amorse, s-a observat o bună organizare a structurii miez-înveliș a fibrei.

Învelișul apare a fi subțire, cu trăsături distincte.

Miezul arată ca o structură asemănătoare unei fibrile β plisate, care este aranjată în doi cilindri concentrici. La întindere, cutele se aplatizează substanțial (Fig.15.15.). Acest model cu fibrili plisați, foarte organizați, poate explica proprietățile excepționale de elasticitate și de rezistență mecanică a mătăsii de draglină.

Miezul interior și cel exterior nu sunt identice din punct de vedere structural. Ele pot avea compoziții proteice diferite sau structuri proteice diferite. Trebuie notat că la multe specii de păianjeni, majoritatea filierelor glandelor dau trei secreții diferite cu formarea a trei straturi în firul de mătase (Fig.15.13.) [19, 54].

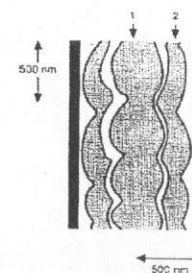


Fig. 15.15. Modelul structural al firului de mătase draglină
1. miezul intern, 2. miezul extern, 3. învelișul exterior [18].

Fibrele rezultate din filierele glandelor ampulacee majorei de la *Nephila golden* prezintă variații în diametru și finețe [22], au secțiunea transversală circulară și sunt cilindrice. Testul de rupere a fibrei la întindere arată o ruptură flexibilă. Fibrele au o tenacitate de 45,9 cN /tex, cu o întindere în lungime de 36–38%.

Fibrele de draglină sunt foarte sensibile la umiditate și, la creșterea umidității, au tendința de umflare. Fibrele tratate cu apă ajung la o alungire de 56%. Difracția cu raze X a fibrelor întinse arată o cristalinătate de 17,5%. Temperatura de contracție este de circa 185°C.

Proprietățile mecanice ale mătăsii de draglină sunt hotărâtor legate de structura intramoleculară și organizarea intermoleculară a proteinei mătăsii de păianjen [12, 23].

Mătasea de păianjen poate fi socotită ca un material compozit, o matrice semiamorfă ranforsată cu particule mici (< 10 nm) nano-cristaline [13, 14, 47].

Secvența aminoacizilor pentru proteina mătăsii de draglină este compusă din poli (A) [poli (alanina)], iar pentru câteva tipuri de mătase, aceasta s-a substituit cu secvența poli (GA) [poli (glicinalanina)] și secvențe bogate în glicină [11, 23, 24]. Organizarea exactă a structurii mătăsii de draglină trebuie încă precizată [5]. Schemele de 4 la 10 resturi de poli (A) și poli (GA) implică formarea de particule de lanțuri- β nanocristaline.

Pentru secvențele bogate în glicină sunt păreri că au loc plisări sub forma unor structuri non- α -elicoideale în cazul GGX sau în β -spirale pentru GPG-

GX și, astfel, se formează matricea semiamorfă [15, 23, 51]. Pe de altă parte, sunt unele păreri că, în acest mod, cea mai mică parte a secvenței bogate în glicină poate fi cuprinsă în lanțuri- β și/sau se formează o interfază între partea cristalină și matricea semiamorfă [16].

Experimentele RMN și difracția cu raze X arată că particulele cristaline sunt bine orientate de-a lungul fibrei de mătase, paralel cu lanțurile polipeptidice [14, 17, 25, 26, 27, 28, 47].

Aceste constatări sugerează că moleculele proteice sunt, în general, bine orientate în fibra de mătase. Acest înalt grad de orientare moleculară, împreună cu organizarea structurală a proteinei mătăsii de draglină, este cerut de proprietățile mecanice unice ale întregului fir de mătase [29].

Proteinele recombinante ale mătăsii de păianjen [30–32] au avantajul, față de mătasea de draglină, de a se putea cerceta o singură moleculă. Proteinelor recombinante ale mătăsii de păianjen le-a fost cunoscută precis secvența și pot fi purificate în condiții adecvate. Proteinele mătăsii naturale de draglină sunt mai dificil de solubilizat după ce au luat forma de fibră.

După părerea generală, două secvențe, SPI și SPII, reprezintă elementele de mare importanță, repetitive, ale proteinelor mătăsii de draglină. Un grup de proteine recombinante ale mătăsii de păianjen au fost sintetizate de la secvențele SPI și SPII [33].

Secvența SPI constă din 38 aminoacizi (aa), conform secvenței de la *Nephila clavipes*, care cuprinde 16-aa [poli (A) și poli (GA)], flancați de o parte și de alta de 22 aa (11 a + 11a) fragmente de lanț bogate în glicină, GGX:

N-SGRGGLGGQGA GAAAAAAAAAAGGAGQ GGYGGLGSQGT

GGX	poli (GA)	GGX	
Secvență non- β	Secvență β	Secvență non- β	

SPI are lungimea de 14,1 nm când este complet extinsă.

Secvența SPII constă din 12 aminoacizi (aa), conform secvenței de la *Nephila clavipes*:

SGPGGYGPGQQT

SPII are lungimea de 4,4 nm când este complet extinsă.

Măsurarea dicroismului circular total al proteinelor din acest grup de proteine, arată că aproape 2/3 din structura secundară a proteinelor modulare a (SPI)_n este formată din lanțuri- β și restul este, de cele mai multe ori, alcătuit din β -spirale sau structuri similare cu o nesemnificativă cantitate de structuri α -elicooidale [33].

Aceste observații sunt în acord cu datele obținute, în prealabil, la fibrele native de mătase de draglină [11, 27] și sugerează că proteinele sintetice recombinante modulare SPI și SPII au o structură foarte asemănătoare (dar nu identică) cu a proteinelor native de mătase de draglină.

Firul de draglină, așa cum s-a arătat mai sus, este compus din două proteine ce constau, în mare măsură, din secvențe care se repetă [34].

La cei mai mulți păianjeni, regiunea care se repetă, la una din aceste proteine, este bogată în prolină, ce nu este prezentă în regiunea care se repetă la cealaltă proteină [35]. Absența prolinei la o componentă duce la supoziția că aceasta este esențială pentru structura firului [36].

Pentru elucidarea problemei s-au analizat proteinele mătăsii de draglină a păianjenului de grădină *Araneus diadematus*, ADF-3 și ADF-4, care, amândouă, sunt bogate în prolină, întrebându-se sistemul baculovirus pentru a se realiza proteine recombinante. În timp ce ADF-3 este reprezentată de o proteină solubilă, ADF-4 este insolubilă „in vitro” și se autoasamblează, în filamente, în citosolul celulelor insectei gazdă.

Filamentele ADF-4 manifestă o excepțională stabilitate chimică, ca și a fibrelor autentice de mătase. Proprietățile ADF-3 și ADF-4 sunt puternic dependente de caracteristicile intrinseci ca hidropatia, care diferă mult între cele două proteine, la fel ca la cele mai multe proteine ale mătăsii de draglină de la alte specii *Araneoidea*, dar nu și cu privire la conținutul în prolină.

Proprietățile mătăsii de draglină sunt legate de compoziția sa de polimer semicristalin [37], care are regiunile cristaline incluse în matricea amorfă, mai puțin organizată. Difracția cu raze X și RMN arată că regiunile cristaline con-

stau din lanțuri- β plisate de polialanină extinse, care dau rezistență firului [38, 39] și structura bogată în glicină 3_1 -helix care dă elasticitate [40].

Mătășurile de draglină conțin două proteine principale diferite, cu mase moleculare mai mari de 11 kDa [46]. Pe baza analogiei secvențelor, proteinele mătăsii de draglină au fost grupate în spidroin 1 (MaSp1) și spidroin 2 (MaSp2) [34]. În timp ce regiunile care se repetă a proteinei MaSp1 sunt, în esență, lipsite de prolină, proteina MaSp2, în regiunile care se repetă, conține, în mod obișnuit, 15% resturi de prolină.

Tabelul 15.2.

Compoziția în aminoacizi (% mol) a fibrelor proteice [48]

Aminoacid	Serină	Fibroină	Keratină (lână)	Draglină
Glicină	13,9	43,7	8,4	37,1
Alanină	5,9	28,8	5,5	21,1
Valină	2,7	2,2	5,6	1,8
Leucină	1,1	0,5	7,8	3,8
Izoleucină	0,7	0,7	3,3	0,9
Serină	33,4	11,9	11,6	4,5
Treonină	9,7	0,9	6,9	1,7
Acid aspartic	16,7	1,3	5,9	2,5
Acid glutamic	4,4	1,0	11,3	9,2
Fenilalanină	0,5	0,6	2,8	0,7
Tirozină	2,6	5,1	3,5	-
Lizină	3,3	0,3	2,6	0,5
Histidină	1,3	0,2	0,9	0,5
Arginină	3,1	0,5	6,4	7,6
Prolină	0,6	0,5	6,8	4,3
Triptofan	0,2	0,3	0,5	2,9
Cistină	0,1	0,2	9,8	0,3
Metionină	0,04	0,1	0,4	0,4

Se pare că, proteina fără prolină MaSp1 este responsabilă pentru formarea regiunilor cristaline, în timp ce proteina care conține prolină MaSp2 este pre-

supusă a forma matricea amorfă din jurul cristalelor [36, 46]. Conform acestui model, prezența proteinei fără prolină este esențială pentru integritatea structurii mătăsii semicristaline.

Mătasea de draglină a *Araneus diadematus* este compusă din două spidroine 2, proteinele ADF-3 și ADF-4 și prezintă caracteristici asemănătoare mătăsurilor altor păianjeni [37]. Se poate deduce că firul de mătase în care ambele proteine sunt bogate în prolină, poate forma structuri care să confere firului proprietăți mecanice deosebite. De altfel, sunt insuficiente cunoștințe despre structura, funcțiile și posibilele influențe reciproce între componentii proteici ai firelor mătăsii de draglină.

Tabelul 14.2.

Caracteristici biofizice ale proteinelor de mătase dragline [34].

	Unități repetate	Hidropaticitatea	Sarcina relativă, %
<i>Araneus diadematus</i>			
ADF-4 / ADF-3	8 / 12	- 0,3 / - 0,9	1,0 / 0,0
<i>Argiope aurantia</i>			
MaSp1 / MaSp2	8 / 5	- 0,0 / - 0,5	2,0 / 0,9
<i>Argiope trifasciata</i>			
MaSp1 / MaSp2	14 / 7	- 0,1 / - 0,7	1,9 / 0,9
<i>Lactrodectus geometricus</i>			
MaSp1 / MaSp2	8 / 11	- 0,1 / - 0,2	1,7 / 0,9
<i>Nephila clavipes</i>			
MaSp1 / MaSp2	16 / 11	- 0,0 / - 0,6	2,5 / 0,7
<i>Nephila madagascariensis</i>			
MaSp1 / MaSp2	3 / 9	- 0,1 / - 0,7	1,9 / 0,3
<i>Nephila senegalensis</i>			
MaSp1 / MaSp2	5 / 5	- 0,1 / - 0,2	2,4 / 0,9

Notă: Hidropaticitatea s-a calculat după Kyte și Doolittle (25 d). Valorile mai mari ale hidropaticității conduc la o mai mare hidrofobicitate a proteinei. Încărcarea relativă este dată ca procentaj al sarcinii tuturor aminoacizilor.

Diferitele solubilități ale ADF-3 și ADF-4 pot fi explicate prin hidrofobicitatea celor două proteine (Tabelul 14.2.) [34]. Hidrofilia mai mare a ADF-

3 face favorabilă interacțiunea cu solventul apos și poate rămâne solubilă în diverse condiții. ADF-4, care este mult mai hidrofobă, interacționează mai ușor cu alte molecule de proteine, tizând astfel spre a se agrega.

Experiențele cu proteine sintetice ale mătăsii de păianjen au arătat că proteinele cu hidrofobicitate asemănătoare cu a ADF-3 și ADF-4 prezintă o solubilitate asemănătoare [47].

Din tabelul 14.2., se constată că toate perechile de proteine ale mătăsii de draglină de la diferitele specii de păianjeni prezintă o distribuție distinctă a hidrofobității și a sarcinii electrice.

MaSp1/ADF-4 sunt proteine care prezintă o hidrofobicitate relativ ridicată și cu mai mult de 1% încărcare electrică, în timp ce proteina partener, corespunzând la MaSp2/ADF-3, este mult mai hidrofilă și cu o încărcare electrică sub 1%.

15.6. POSIBILITĂȚI DE UTILIZARE A FIRELOR DE MĂTASE DE PĂIANJEN

Se cunoaște că mătasea de păianjen a fost folosită în Pacificul de Sud, la confecționarea unor plase de pescuit și la obținerea de țesături.

Se sugerează unele utilizări ale firului de mătase de păianjen pentru veste antiglonț, coarde de parașutism, frânghii, cabluri pentru ambarcațiuni, plase de pescuit, aplicații aerospațiale (în special datorită raportului rezistență/greutate), parașute individuale și pentru nave de zbor, îmbrăcăminte-încălțăminte cu rezistență infinită la uzură, centuri de siguranță, elemente absorbante de șoc oxidabile pentru autovehicule; bandaje, fire de sutură, tendoane artificiale și suporturi pentru vasele de sânge fragile etc.

Se studiază geometria plaselor păianjenilor, încercându-se a se stabili cum pot absorbi forțe de impact incredibil de mari față de grosimea firelor, iar acestea, chiar parțial distruse, nu colapsează.

În urma cercetărilor întreprinse, cercetătorii au afirmat că o plasă din draglină, suficient de mare, cu grosimea firului cât cea a unui creion Bic, ar putea să rețină, fără să se rupă, un aparat Boeing 777 aflat la viteza de croazieră (circa 150t la 900Km/h).

În scopul realizării unor fire cu caracteristicile fizico-mecanice și biochimice asemănătoare firelor de draglină, în ultimele decenii, colective de cercetare, mai ales de la unele universități și institute de cercetări din SUA, Canada și Germania, au făcut progrese însemnate în ceea ce privește cunoașterea proceselor biologice de producere a firului mătăsii unor păianjeni, cunoașterea structurii morfologice și chimice a firului de mătase și a principalelor caracteristici ale sale.

De asemenea, s-au făcut progrese deosebite în încercările de producere pe bază de biosinteză și sinteză a unui fir asemănător.

S-au experimentat clonări cu gene ale păianjenilor pe bacteria *Escherichia coli*, încercări cu sistemul baculovirus, clonări pe capre pentru a se înlocui cazeina din laptele lor cu proteine care se găsesc în mătasea de păianjen.

Sunt încă păreri împărțite în ceea ce privește, mai ales, structura chimică a firelor mătăsii de draglină și alte aspecte care trebuie lămurite.

Bibliografie

1. Hinman M.B., Jones J.A., Lewis R.V., Trends Biotechnol. 18, pp. 374-379, 2000.
2. Hayashi C.Y., Shipley N.H., Lewis R.V., Int.J. Biol. Macromol., 24, p. 271-275, 1999.
3. Tirrell D.A., Science 271, pp. 39-40, 1996.
4. Cunniff P.M., Fossey S.A., Auerbach M.A., Song J.W., Kaplan D.L., Adams W.W., Eby R.K., Mehoney D., Vezie D., Polym. Adv. Technol., 5, p. 401-410, 1994.
5. Oroudjev E., Soares J., Arcidiacono S., Thompson J.B., Fossey S.A., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 99 (2), p. 6460-6465, 2002.
6. James H.J., Am. Med. And Hygiene tropical, 71, p. 230-235, 2004.
7. Brehm A.E., *Das Tierreich nach Brehm*, 1961, Leipzig-Urania-Verlag-Jena. În: Lumea Animalelor după Brehm, Editura Științifică, București, 1964.
8. Smith B.L., Schaffer T.E., Viani M., Thompson J. B., Frederick N.A., Kindt J., Belcher A., Stucky G.D., Morse D.E., Hansma P.K., Nature, 399, pp. 761-763, 1999.

9. Gosline J.M., Denny M.W., DeMont M.E., *Nature*, 309, p.551-552, 1984.
10. Kaplan D.L., Lombardi S.J., Silks, *Chemistry, Properties of spider silk*, D. Byrom Ed., New York, Stockton, 1991.
11. Xu M., Lewis R.V., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, p. 7120-7124, 1990.
12. Billmeyer F. W., *Textbook of Polymer Science*, New York, John Wiley & Sons, 1984.
13. Lombardi S.J., Kaplan D.L., *Polym. Preprins*, 31 (1), p. 195-196, 1990.
14. Stinson S.A.C., *Biotechnology providing springboard to new functional materials* C & EN, 16, p. 26-32, 1990.
15. Magoshi J.M., Mizuide M., *J. Polym. Sci. : Polym Phys. Ed.* 17, p. 515-520, 1979.
16. Iizuka E., *J. Appl. Polym. Sci.*, 41, p.173-185, 1985.
17. Magoshi J.M., Magoshi Y.J., *Appl. Polym. Symp.*, 41, p.173-185, 1985.
18. Li S.F.Y., McGhie A.J., Tang S.L., *Biophysical J.*, 66, p.1209-1212, 1994.
19. Kovoov J., in *Ecophysiology of Spiders*, W. Neutwig, editor, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 1987.
20. Gosline J.M., DeMont M.E., Denny M.W., *Endeavour*, 10, p.37-43, 1986.
21. Vollrath F., *Sci. Am.*, 226, p.70-76, 1992.
22. Rengasamy R.S., Jassal M., Rameshkumar C., *AUTER Research J.*, vol. 5, nr.1, 2005.
23. Zemlin J.C., *A study of the mechanical behavior of spider silk*, Natick MA, US Army, Natick Laboratories. Report 69-29-CM (AD 684333).
24. Yomaura K., Okumura Y., *J. Appl. Polym. Sci.: Appl. Polym. Symp.*, 41, p.205-220, 1985.
25. Magoshi J., Magoshi Y., *Polymer. Commun.*, p.309-311, 1985.
26. Zheng S., Li G., *Appl. Spect.*, 47 (7), p. 1269-1272, 1989.
27. Weiss R.A., Ober C.K., Ed. *Liquid Crystalline Polymers*. Am. Ch. Society Symposium Series, Washington D.C., American Chemical Society, 1990.
28. Kerkam K., Viney C., Kaplan D. L., Lombardi S., *Nature*, 349, p. 596-598, 1991.
29. Viney C., *The Nature and Role of Liquid Crystalline Order in Silk Secretions*. In : *Structure, Cellular Synthesis and Assembly of Biopolymers*; S.T. Case (Ed), Heidelberg, Springer Verlag, 2005.
30. Iizuka E., *J. Appl. Polym. Sci. : Appl. Polym Symposium*, 41, p. 163-171, 1985.
31. Dobb M.G., McIntyre J.E. *Adv. In Polym. Sci.*, 60 / 61, p.61-98, 1984.
32. Kerkam K., Kaplan D.L., *Liquide Crystalline Characteristics of Natural Silk Secretion*. In : *Materials Synthesis Based on Biological Processes*; M. Alper et al. (Eds) Pittsburgh, Materials Research Society, pp. 239-244.

33. Asakura T., *Macromoleculares Chemie, Rapid Communication*, 7 (12), p. 755-759, 1986.
34. Huemmerich D., Scheibel T., Vollrath F., Cohen S., Gat U., Ittah S., *Current Biology*, 14, p. 2070-2074, 2004.
35. Gatesy J., Hayashi C., Motriuk D., Woods J., Lewis R.V., *Science*, 291, p. 2603-2605, 2001.
36. Thiel B.L., Guess K.B., Viney C., *Biopolymers*, 41, p. 703-719, 1997.
37. Gosline J.M., Guerette P.A., Ortlepp C.S., Savage K.N., *J. Exp. Biol.* 202, p. 3295-3303, 1999.
38. Simmons A.H., Ray E., Jelinski L.W., *Macromolecules*, 27, p. 5235-5237, 1994.
39. Parkhe A.D., Seeley S.K., Garduer K., Thompson L., Lewis R.V., *J. Mol. Recognit.*, 10, p. 1-6, 1997.
40. Van Beek J.D., Hess S., Vollrath F., Meier B.H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, p. 10266-10271, 2002.
41. Hijirida D.H., Do K. G., Michal C. Wong S., Yax D., Jelinski L.W., *Biophys. J.*, 71, p. 3442-3447, 1996.
42. Knight D.P., Vollrath F., *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 266, p.519-523, 1999.
43. Knight D.P., Vollrath F., *Naturwissenschaften*, 88, p. 179-182, 2001.
44. Foelix R., *Biology of Spiders*, Oxford University Press, 2011.
45. Hyoung-Joon Jin, Kaplan D.L., *Mechanism of silk processing in insects and spiders*, *Nature*, 424, 1057-1061, 2003.
46. Vollrath F., Knight D.P., Hu X.W., *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.*, 265, p. 817-820, 1998.
47. Scheibel T., Zahn H., Krasowski A., *Silk*, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Vol.33, 2011.
48. Kunal Singha, Subhankar Maity, Mrinal Singha, *Spinning and Applications of Spider Silk*, *Frontiers in Science*, 2, 5, 92-100, 2012.
49. Heim M., Römer L., Scheibel T., *Chemical Society Reviews*, 39, 156-164, 2010.
50. Ventre M., Causa F., et al., *Research in Biomaterials and Tissue Engineering, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 128, 2015.
51. Knight D.P., Knight M.M., Vollrath F., *J. Biol. Macromol.*, 27, p.205-210, 2000.
52. Winkler S., Kaplan D., Cheley S., Bayley H., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 49, p. 31-38, 1998.
53. Huemmerich D., Helsen C.W., Oschmann J., Rudolph R., Scheibel T., *Biochemistry*, 43, p. 13604-13612, 2004.
54. Kyte J., Doolittle R.T., *J. Mol. Biol.* p. 105-132, 1982.

55. <https://tpesoiearaignee.wordpress.com/category/1-laraignee-et-sa-soie/>, 16.2.2018
56. Van Nimmen, Els, Gellynck, Kris, Van Langenhove, Lieva, Mertens, Johan, *Tensile Properties of Cocoon Silk of the Spider Araneus diadematus*, The Textile Research Journal, 2006.
57. <https://www.livescience.com/20364-tarantulas-shoot-spidey-silk-debate.html>, 7.02.2018
58. Babu K.M., *Silk Processing, properties and applications*, The Textile Institute, Woodhead Publishing Ltd., Oxford, Cambridge, 2013.
59. Tillinghast E.K., Chase S.F., Townley M.A., *Water extraction by the major ampullate duct during silk formation in the spider, Argiope aurantia Lucas*, Journal of Insect Physiology, 30, 7, 591-596, 1984.
60. Kaplan DL, Adams W, et al., *Silk polymers: materials science and biotechnology*, Washington, DC: Am. Chem. Soc. Symp. Series, 544, 1994.
61. Moy RL, Lee A, Zalka A., *Commonly used suture materials in skin surgery*, Am. Fam. Physician., 44, 2123-8, 1997.
62. Minoura N, Aiba S, Gotoh Y, Tsukada M, Imai Y., *Attachment and growth of cultured fibroblast cells on silk protein matrices*, J. Biomed. Mater. Res., 29, 1215-21, 1995.
63. Townle M.A. et al., *Changes in composition of spider orb web sticky droplets with starvation and web removal, and synthesis of sticky droplet compounds*, J. Exp. Biol., 209, 8, 1463-1486, 2006.
64. Ping Xiang, Shan-Shan Wang, *The in vitro and in vivo biocompatibility evaluation of electrospun recombinant spider silk protein/PCL/gelatin for small caliber vascular tissue engineering scaffolds*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 163, 19-28, 2018.
65. Frank K. Ko, Lynn Y. Wan, *Engineering properties of spider silk*, Handbook of Properties of Textile and Technical Fibres (Second Edition), 185-220, 2018.
66. Babu K.M., *Silk from silkworms and spiders as high-performance fibers*, Structure and Properties of High-Performance Fibers, Woodhead Publishing Series in Textiles, 327-366, 2017.
67. A. Lin, T. Chuang, T. Pham, C. Ho, C. Vierra, *Advances in understanding the properties of spider silk*, Advances in Silk Science and Technology, 17-40, 2015
68. Alan M. Edlund, Justin Jones et al., *Economic feasibility and environmental impact of synthetic spider silk production from escherichia coli*, New Biotechnology, 42, 12-18, 2018.

CAPITOLUL 16

MĂTASEA DE VIERMI DE MĂTASE

16.1.	Noțiuni generale de sericultură	1257
16.2.	Compoziția chimică a mătăsii	1260
16.3.	Structura mătăsii	1265
16.4.	Proprietățile mecanice ale mătăsii	1270
16.5.	Proprietățile fizice ale mătăsii	1272
16.6.	Proprietățile chimice ale mătăsii	1273
16.7.	Sericina	1279
16.8.	Producția de mătase	1281
16.9.	Utilizări ale mătăsii	1283
16.9.1.	Aplicații biomedicale ale mătăsii	1283

Bibliografie

1287

16.1. NOȚIUNI GENERALE DE SERICULTURĂ

Mătasea viermilor de mătase este o fibră proteică valoroasă pentru industria textilă și un biomaterial cu aplicații în medicină.

Cel mai cunoscut tip de mătase s-a obținut din gogoșile viermilor de mătase care se hrănesc cu frunze de dud, *Bombyx mori*, crescuți în captivitate (sericultură). Sericultura are ca obiect creșterea viermilor de mătase, larva (omida) unui fluture, mai ales, specia *Bombyx mori*. Reprezintă un ansamblu de operații care cuprind: cultura dudului, creșterea viermilor de mătase, obținerea gogoșilor (coconilor), depănarea fibrelor de pe gogoși și filatura mătăsii. Creșterea

viermilor are loc pornindu-se de la ouăle fecundate ale fluturilor femele, numite obișnuit sămânță.

China este locul de origine a creșterii viermilor de mătase, începând cu circa 5000 de ani în urmă, iar în prezent, produce peste 50% din totalul cantității de mătase naturală, care pe plan mondial, este de 50000–65000 tone/an. Din unele statistici, China, India, Japonia și Rusia produc circa 90% din totalul cantității de mătase de pe plan mondial. Mătasea naturală reprezintă aproximativ 0,1–0,15% din totalul fibrelor textile ce se folosesc în lume [1, 2, 3].

Viermele de mătase *Bombyx mori* provine de la speciile sălbatice *Bombyx mandarina* și *Theofila religiosae* și se hrănește cu frunze de dud. Familia *Bombycidae*, din care face parte *Bombyx mori*, cuprinde circa 70 de specii.

Din această familie fac parte și specii sălbatice sau semisălbatice.

Astfel, specia *Anthéreea*, originară din Extremul Orient, care cuprinde mai multe varietăți, din care *Anthéreea Yamama Guér* (originară din Japonia) și *Anthéreea Pernyi Guér* (originară din China) se hrănesc cu frunze de stejar, produc gogoși cu exteriorul pereților încheiați și a căror mătase se poate depăna [4, 5, 6, 33].

Specia *Phylosamia ricini*, familia *Saturnidae* provine din China și India, se hrănește cu frunze de ricin și produce gogoși de pe care mătasea se poate depăna.

Mătasea provenită de la speciile nedomestice are diametrul fibrei de 30–60 μm, față de 20–25 microni cât are fibra de la *Bombyx mori* și, în consecință, are o rezistență mai mare. Fibra conține mai puțină sericină (5–8%) și este mai rezistentă la acțiunea acizilor și alcaliilor. Servește la producerea unor articole la care se cere mai multă rezistență (parașute, umbrele etc.).

Metamorfoza fluturului *Bombyx mori* constă din patru etape: ou, larvă (omidă), crisalidă (nimfă) și fluture (Fig. 16.1).

Oul este de formă ovală, cu greutatea de 0,5–0,8 mg, la exterior prezintă un înveliș prevăzut cu mai multe orificii microscopice, care asigură respirația larvei în curs de formare. Oul este prevăzut și cu un orificiu mai mare (*micropilul*), prin care se face fecundarea înainte de depunerea ouălor de către fluturile fe-

melă. Tot prin micropil, are loc ieșirea larvei ce se formează în ou, care are lungimea de 2–3 mm și este acoperită de peri.

Larva se dezvoltă în timp de 30–35 zile până la maturitate, ajungând la o lungime de 9–10 cm. În acest timp năpârlește de patru ori, apoi are loc țeserea coconului (gogoșii), după care, în interiorul coconului, larva se transformă în clisaridă (nimfă), din care se va forma fluturele.

La depănarea gogoșii rezultă 300–1200 m de fir, chiar și mai mult, în funcție de specie și de condițiile de viață.

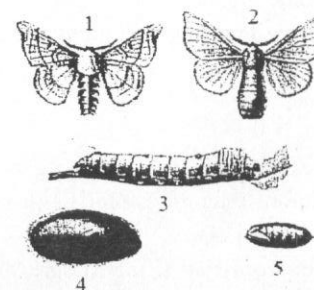


Fig. 16.1. Forme de alternanță în cursul dezvoltării viermelui de mătase *Bombyx mori*. 1. fluturele mascul; 2. fluturele femelă; 3. larva (omida); 4. coconul (gogoșa); 5. crisalida (nimfa).

Metamorfoza fluturului de mătase prezintă o particularitate singulară în ceea ce privește întreruperea dezvoltării pentru a trece de anotimpul rece. Această întrerupere are loc sub formă de ou și nu sub formă de crisalidă, ca în cele mai multe cazuri pentru fluturi.

Corpul omizii este format din cap, torace și abdomen.

Glandele sericigene ale larvei. De-a lungul canalului intestinal și de fiecare parte a corpului larvei, se găsește aparatul de producere a mătăsii. Sunt două glande sub formă de tub, fiecare compusă din trei părți distincte. Prima parte este constituită dintr-un tub capilar foarte răsucit, măsurând 15–25 cm în lungime și 1 mm în diametru, iar în interiorul său se găsește materialul mătăsos elaborat. Acest tub comunică cu un fel de sac alungit, ce servește ca rezervor, unde

se varsă materialul mătăsos, care, în acest stadiu, este gelatinos. De la cealaltă extremitate, a celor două rezervoare, pornește câte un tub capilar. Ambele tuburi capilare se unesc lipindu-se unul de altul, fiecare tub păstrându-și individualitatea. Aceste tuburi, de lungime mică, ies prin buza inferioară al aparatului bucal al larvei. Este filiera prin care iese fibra de mătase.

Mătasea poate fi definită ca o secreție de proteină fibroasă, [7, 8, 9, 10, 11, 12], un biocompozit [13], și reprezintă doar una dintre fibrele naturale produse de diferite vietăți.

Proteinele mătăsii sunt produse de glande inteme, specializate, ale diferitelor specii, dintre care fac parte viermii de mătase, multe alte lepidoptere, păianjenii, scorpionii. Aceste fibre, adesea biocompozite, sunt materiale remarcabile dacă se iau în seamă „tehnologiile de obținere” (biosinteza și secreția) și proprietățile acestora.

Biosinteza are loc în celulele epiteliale ale acestor glande specializate. Secreția se face în lumenul glandelor, unde amestecul de proteine este depozitat înainte de a fi transformat în fibră, în afara organismului.

Mătăsurile diferă în compoziție, proprietăți și morfologie, după proveniență și sunt biosintetizate pentru a îndeplini anumite funcții. Mătasea viermilor de mătase este bine caracterizată datorită largii ei utilizări în textile, de peste 5000 ani [1].

16.2. COMPOZIȚIA CHIMICĂ A MĂTĂSII

Mătasea naturală este un biocompozit cu structură macromoleculară, de natură proteică, constituită din două proteine: *fibroina* și *sericina*, care se diferențiază între ele prin structură chimică și proprietăți, fiecare având un anumit rol în configurația fibrei de mătase.

Mătasea naturală produsă de larva *Bombyx mori* conține 70–80% fibroină și 18–28% sericină. Aceste valori variază în funcție de rasa viermelui și de condițiile de viață, de obicei prin scăderea conținutului în sericină.

Mătasea de *Bombyx mori* conține două filamente de fibroină „încastate” într-un înveliș de sericină, formând o matrice (Fig.16.2.) [49, 71].

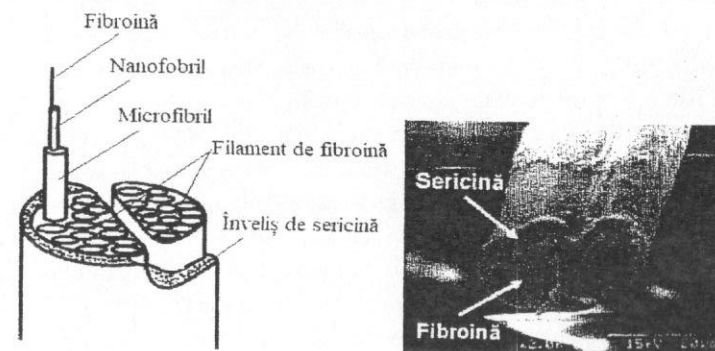


Fig.16.2. Firul de mătase de *Bombyx mori*. Ierarhizare și structură

În afară de fibroină și de sericină, firul de mătase conține 2–3% ceruri, materii grase, hidrocarburi saturate aciclice, pigmenți organici și săruri minerale.

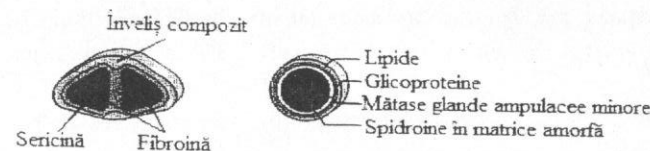


Fig.16.3. Comparație între structurile mătăsii de *Bombyx mori* și *Nephila Clavipes* – secțiuni transversale [71].

În cele două glande ale viermelui de mătase, responsabile pentru producerea mătăsii, macromoleculele proteice, sunt conținute sub formă de soluție concentrată, vâscoasă și în stare neorientată.

Acestea suferă o primă orientare în orificiul îngust al glandei și o alta, la operația de etirare a firului, pe care o efectuează viermele. În această stare întinsă se stabilesc, între macromolecule, legături transversale de hidrogen [18].

Conținutul în aminoacizi al fibroinei, comparativ cu al lânii și collagenului este dat în tabelul 16.1. [12, 13, 14, 15].

Tabelul 16.1.

Conținutul în aminoacizi al fibroinei, lânii și collagenului, exprimat în procente molare

Aminoacidul	Fibroina	Lâna	Collagenul
Glicină	4,6	8,1	33,0
Alanină	29,4	5,0	9,7
Serină	12,2	10,2	4,3
Acid glutamic + Glutamină	1,0	11,1	6,1
Cistină	—	10,2	—
Prolină	0,3	7,5	11,2
Arginină	0,5	7,2	5,0
Leucină	0,5	6,9	2,4
Treonină	0,9	6,5	2,0
Acid asparagic + Asparagină	3,5	10,1	6,8
Valină	—	—	2,4
Hidroxiprolină	—	—	9,2
Hidroxilizină	5,2	4,2	0,4
Tirozină	0,7	2,8	0,9
Izoleucină	0,5	2,4	1,0
Fenilalanină	0,3	2,0	1,2
Lizină	0,2	1,1	2,2
Triptofan	0,2	0,5	0,8
Histidină	—	0,5	0,5
Metionină	urme	0,3	0,6

În tabelul 16.2. se prezintă conținutul în aminoacizi al fibroinei și sericinei de la mătasea din viermele de mătase *Bombyx mori*, de la viermele sălbatic *Phylosamia cynthia ricini* și al draglinei de la păianjenul *Nephila clavipes* [16, 17, 18].

Fibroina din mătasea de *Bombyx mori* conține, în principal, glicină (44,6%), alanină (30,0%) și serină (12,2%), în raportul de 3:2:1 și alți aminoacizi, dintre care, în cantități mai mari sunt: tirozina, valina, acidul asparagic, acidul gluta-

mic, treonina izoleucina asparagina și gluamina (Tabelul 16.1).

Sericina este o proteină care se deosebește de fibroină prin conținutul diferit de aminoacizi și prin structura sa secundară.

Față de fibroină, conține cantități mai mari de hidroxiaminoacizi (serină), aminoacizi dicarboxilici, acizi diaminici și cantități mici de glicină, alanină, tirozină și cisteină (Tabelul 16.2.) [11,16].

Tabelul 16.2.

Compoziția în aminoacizi a mătăsurilor, (% molare)

Aminoacidul	<i>Bombyx mori</i>		<i>Phylosamia cynthia ricini</i>	<i>Nephila clavipes</i>
	fibroină	sericină	fibroină	draglină
Glicină	42,9	13,5	33,2	37,1
Alanină	30,0	5,8	48,4	21,1
Serină	12,2	34,0	5,5	4,5
Tirozină	4,8	3,6	4,5	—
Acid asparagic + Asparagină	2,4	17,7	4,2	10,1
Arginină	0,2	1,4	1,5	0,5
Acid glutamic + Glutamină	1,8	9,7	0,7	9,7
Lizină	2,5	2,9	0,3	2,0
Valină	0,6	0,7	0,3	3,9
Leucină	0,6	0,7	0,4	0,9
Izoleucină	0,7	0,4	0,2	0,7
Fenilalanină	0,5	0,6	0,4	4,3
Prolină	0,9	8,8	0,4	1,7
Treonină	0,1	0,1	urme	0,4
Metionină	urme	0,1	urme	0,3
Cisteină	—	—	0,6	2,9

Cercetările privind secvența aminoacizilor din fibroină au evidențiat existența, în lungimea lanțurilor polipeptidice, a unor zone cristaline formate dominant din aminoacizi nepolari (Gly, Ala, Val, dar și resturi de Ser) și zone amor-

fe, formate dominant din aminoacizi polari, unii cu resturi laterale mari (Ser, Glu, Asp, Asn, Gln, Lys, Tyr etc.).

Utilizându-se metodele de scindare ale lanțurilor polipeptidice pentru determinarea secvenței aminoacizilor (vezi cap. 11 și 12) s-au pus în evidență secvențe de dipeptide, tripeptide, tetrapeptide, pentapeptide, hexapeptide, care se repetă și în care se remarcă proporția mare de glicină, alanină, serină alături de alți aminoacizi prezenți într-o proporție mai mică: Ala-Gly, Ala-Ala, Gly-Ala-Gly, X-Ala-Gly-Ala-Gly-Y (în care X și Y sunt alți aminoacizi), Gly-Ala-Gly-Thr, Ala-Gly-Ala-Gly-Thr, Val-Ala-Gly-Ala-Gly-Thr etc. În unele cercetări, s-a utilizat scindarea cu chimotripsină, care rupe lanțul polipeptidic în dreptul tirozinei, pentru a se obține fragmente mai mari de lanț pe care să se stabilească secvența aminoacizilor.

Fibroina este formată din două lanțuri polipeptidice: un lanț lung de aproximativ 325kDa și altul scurt de 25kDa.

În zona cristalină a fibroinei, care se repetă, lanțul lung are 59 de aminoacizi: GAGAGSGAGA[GSGA GA]₈Y. (G = Gly, A = Ala, S = Ser, Y = Tyr sau alți aminoacizi) [22, 23, 56].

Secvențele caracteristice din lanțul lung al fibroinei constau din serii alternative de câte două regiuni: una cu un grad înalt de cristalinitate, formată din 18 secvențe GAGAGS și alta mai puțin cristalină formată din 30 de secvențe GAGAGY, unde Y este Tyr sau Val sau alt aminoacid cu rest lateral mare [24].

Compoziția în aminoacizi a fibroinei mătăsii provenită de la *Bombyx mori* este apropiată de cea a fibroinei de la *Philosamia cynthia ricini*, un vierme de mătase sălbatic. O deosebire mai mare este la conținutul în Ala, Gly și Ser. Suma acestor aminoacizi este aproximativ egală la ambele fibroine, dar la fibroina provenită de la viermele de mătase sălbatic procentul de Ala este mai mare în detrimentul Gly și al Ser (Tabelul 16.2.).

Cistina în fibroină se găsește în cantități foarte mici, chiar sub formă de urme, după unele analize și nu contribuie la formarea de legături transversale. Între lanțurile polipeptidice ale fibroinei nu sunt decât legături de hidrogen și van der Waals. Se pare că tirozina este implicată în interacțiile intermoleculare din structura fibroinei [43, 44, 45].

16.3. STRUCTURA MĂTĂSII

Mătasea (fibroina) este exemplul tipic de β -structură în foaie pliată. Fibroina este constituită din lanțuri polipeptidice paralele cu axa fibrei și conectate lateral prin trei sau mai multe legături de hidrogen, formând structuri β sub forma unor foi pliate, pliarea făcându-se în dreptul C $_{\alpha}$ al aminoacizilor (Fig.16.4. și Fig.16.5.) [15].

Un lanț polipeptidic se leagă cu un lanț antiparalel (Fig.14.1.). Structurile β se formează de-a lungul lanțurilor polipeptidice ale fibroinei, pe anumite porțiuni, care corespund zonelor cristaline foarte bogate în aminoacizi apolari cu resturi laterale mici, prezenți dominant în compoziția lanțurilor polipeptidice ale fibroinei.

Într-o structură secundară în care foile ar fi formate din catene perfect extinse, orientate antiparalel, resturile R ale aminoacizilor, îndreptate în aceeași parte a planului, nu ar avea loc și s-ar împiedica reciproc. Numai poliglicina sintetică, care nu are resturi R, poate forma foi similare acestui model [19].

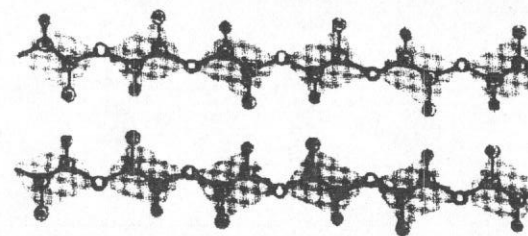


Fig.16.4. Punțile de hidrogen în interiorul unei foi β -pliate, formate din lanțuri antiparalele. Liniile punctate, fără extremități, sunt punți de hidrogen cu lanțurile învecinate din interiorul unei foi. Nu sunt arătate lanțurile laterale.

Sferele goale din lanțurile polipeptidice reprezintă C $_{\alpha}$ [15].

Procesul de pliere se recunoaște la lanțurile laterale învecinate, care alternează larg, în sus și în jos, îndepărtându-se în planul foi pliate. Se remarcă faptul că glicina dintr-o foaie formează legături de hidrogen cu alanina și serina dintr-o altă foaie.

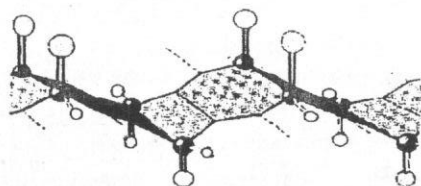


Fig.16.5. Lanțurile laterale stau unul după altul, alternând deasupra și dedesubtul foii pliate. Liniile punctate reprezintă punțile de hidrogen [15].

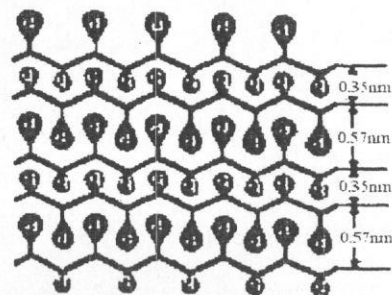


Fig.16.6. La straturile proteice din fibroină se așază împreună Gly cu Gly și Ala cu Ala. Distanța dintre foi alternează între 5,7 și 3,5 Å.

Fibroina prezintă o aranjare β apropiată de aceea a poliglicinei și are o perioadă de identitate de 6,95 Å, ceea ce indică doar o ușoară pliere a catenelor pentru a face loc resturilor laterale ale aminoacizilor. Depărtarea între lanțurile antiparalele din foaia pliată este de 4,7 Å. Această structură a foii pliate pune astfel laolaltă glicina cu glicina, cât și alanina și serina cu alanina (Fig.16.7. și Fig.16.8.). Rezultatul este o fibră foarte puternică și cu o elasticitate mică, deoarece lanțurile sunt astfel depărtate între ele și întinse, fără ca punțile de hidrogen să se rupă, iar foaia pliată este consistentă.

Röntgenograma fibroinei arată o reflexie puternică ecuatorială conformă perioadelor 9,18 ; 4,59 ; 4,33 și 3,06 Å [20] (Fig. 16.9.). Studiile cu raze X au arătat o orientare relativ înaltă a lanțurilor polipeptidice ale fibroinei, cristali-

nitătea fiind de 40–60% [11,12]. Structura tridimensională a fibroinei din mătasea naturală este reprezentată în figurile 16.7. și 16.8.

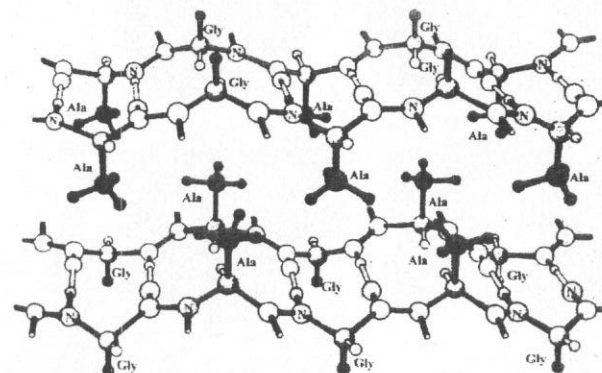


Fig.16.7. Forma tridimensională a fibroinei. Lanțurile laterale ale unei foi se îmbină, între lanțurile principale, cu lanțurile laterale din foaia vecină.

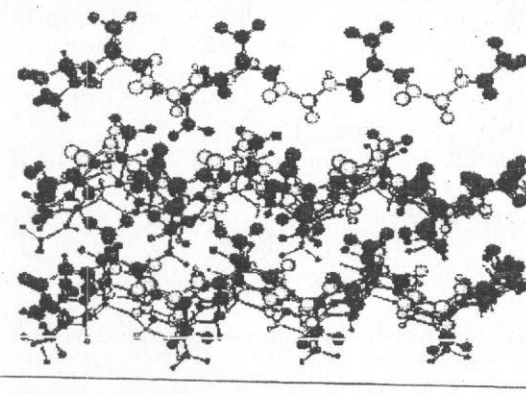


Fig.16.8. Structura spațială a fibroinei, modelare chimică computerizată. Lanțurile polipeptidice sunt orientate în direcția săgeții.

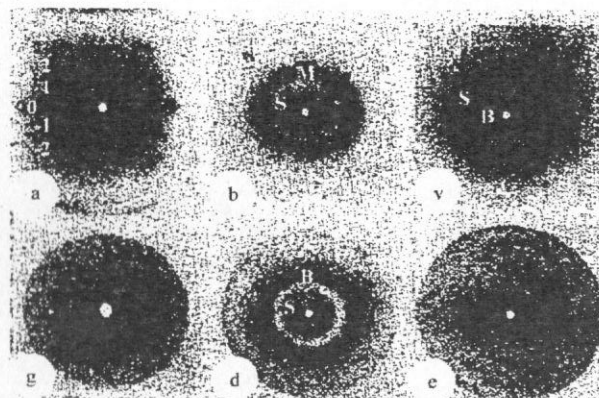


Fig. 16.9.

- a – Röntgenograma mătăsii naturale de la viermele de mătase *Bombyx mori*, iradiere cu $\text{Cu K}\alpha$ pe axul vertical al fibrei [21];
 b – Röntgenograma părului uman neîntins (α -keratina), iradiații cu $\text{Cu K}\alpha$ pe axul vertical al fibrei,
 M – reflexie meridională [21];
 v – Röntgenograma părului uman întins în atmosferă de vapori de apă (β -keratina), în comparație cu lungimea inițială, iradiație cu $\text{Cu K}\alpha$ pe axul vertical al fibrei;
 V – reflexie corespunzătoare lanțurilor principale întinse;
 S – reflexie corespunzătoare grupelor laterale [22];
 g – röntgenogramă comparativă obținută prin evidențierea α -miozinei și a α -keratinei dintr-o peliculă;
 d – röntgenograma epidermului contractat la 95°C și întinsă cu 80%, transversală x forma β ;
 V – reflexie corespunzătoare lanțurilor principale întinse, răspândită în meridian;
 e – röntgenograma collagenului uscat de coadă de șobolan, iradiat cu $\text{Cu K}\alpha$, pe axul vertical al fibrei [21].

Zonele cristaline sunt formate, în primul rând, din aminoacizi cu resturi laterale foarte puțin voluminoase, care permit o împachetare compactă, cu legături interlanțuri numeroase (legături de hidrogen, forțe van der Waals) și cu reactivitate scăzută. Părțile amorfe, care conțin aminoacizi cu resturi laterale

voluminoase, au o ordonare mai scăzută și o accesibilitate mai mare a reactanților chimici.

Diferenții viermi de mătase produc proteine cu conținuturi variate de aminoacizi, care influențează proprietățile fizico-chimice ale mătásurilor, din cauza raportului dintre zonele cristaline și cele amorfe ce se formează [12].

Cu cât procentul de aminoacizi cu resturi laterale mari crește, cu atât se vor mări zonele amorfe.

Mătasea rezultată de la *Bombyx mori* conține 13% alți aminoacizi decât cei trei dominanți (Gly, Ala, Ser) iar aceștia din urmă vor crea zone amorfe totalizând 40%; mătasea de la *Anaphe moloneyi* conține 5% aminoacizi cu resturi laterale mari, iar mătasea de la *Antherea mylitta* 29% de astfel de aminoacizi.

Cu cât aminoacizii cu resturi laterale mari sunt prezenți în procent mai ridicat, cu atât zonele amorfe din fibra de mătase sunt mai extinse, iar fibra de mătase prezintă o alungire la rupere mai mare (Fig.16.10.).

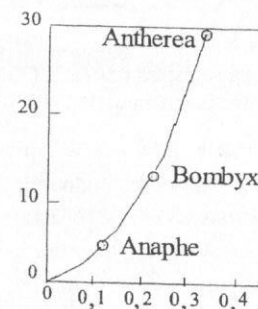


Fig.16.10. Corelația dintre alungirea la rupere și conținutul în aminoacizi cu resturi laterale mari în mătasea de viermi de mătase [12].

Analizele RMN și difracția cu raze X au arătat că regiunile cristaline sunt foi pliate β cu legături polialaninice, care conferă rezistență firelor, iar structura predominantă secundară a matricii amorfe este bogată în resturi de glicină [25], care conferă elasticitate ansamblului.

Ca și în cazul celorlalte proteine fibroase (colagen, keratină, mătasea de păianjen etc.) și fibroina are o structură morfologică care poate fi prezentată

ierarhizat. Astfel, mai multe foi pliate β formează o microfibrilă, mai multe microfibrile constituie o fibrilă și mai multe fibrile formează un filament din cele două filamente din care este constituită fibra de mătase. Cele două filamente sunt separate și cuprinse într-o matrice de sericină.

Pe baza unor date medii, o microfibrilă are diametrul de 10–15 nm, o fibrilă conține circa 1000 de microfibrile, iar un filament are diametrul de 15000 nm și este format din circa 530 fibrile dispuse în 13 straturi circulare.

16.4. PROPRIETĂȚILE MECANICE ALE MĂTĂSII

Mătasea este mai puțin densă decât alte fibre naturale, cum ar fi bumbacul și lâna, și absoarbe apă până la 30% din propria greutate, fără să se ude. Rezistă mai bine la căldură decât lâna, descompunându-se la 170°C.

Firele de mătase de *Bombyx mori* au diametrul de 10–25 μm , în timp ce mătasea de *Nephila clavipes* formează fibre de 2,5–4,5 μm în diametru.

Firele de mătase de la viermii de mătase sălbatici au diametrul de până la 65 μm , cu neregularități pe lungimea firului.

Proprietățile mecanice ale firelor de mătase sunt dependente de combinația între tenacitatea ridicată, extensibilitatea și compresibilitatea acestora. Unele mătăsuri au o alungire de peste 200% și altele au o elasticitate apropiată de aceea a fibrelor de înaltă performanță. În ceea ce privește absorbția energiei până la efortul de rupere, mătasea are o bună comportare (Tabelul 16.3.) [16].

Mătăsurile de păianjen au alungiri mai mici și rezistențe mai mari decât mătăsurile de viermi de mătase.

Analizele cu raze X în corelație cu rezistențele mecanice, duc la concluzia că gradul de cristalinitate mai mare al fibrelor duce la creșterea rezistențelor mecanice și la micșorarea alungirilor [29, 30].

Mătasea este cea mai rezistentă fibră textilă naturală. Rezistența sa specifică ajunge până la 68 daN/mm². Astfel, un fir de mătase cu diametrul de un milimetru suportă o sarcină de 40–42 Kg. Un singur filament de mătase, lung de 1 m, are o rezistență de 4–13 g [34].

Tabelul 16.3.

Proprietățile mecanice ale mătăsii de viermi de mătase în comparație cu alte fibre (1 GPa=10⁹ N/m²).

Fibra	Alungirea %	Rezistența tracțiune (GPa)	Energia la rupere (J/kg)
Draglina păianjenului			
<i>Nephila clavipes</i>	9 – 10	1,1 – 2,9	3,7 x 10 ⁴
Draglina altor păianjeni	10 – 39	0,2 – 1,8	1–10 x 10 ⁴
Fibroina de Bombyx mori	15 – 35	0,6	7 x 10 ⁴
Fibroina altor viermi de mătase	12 – 50	0,1 – 0,6	3 – 6 x 10 ⁴
Nylonul	18 – 26	0,5	8 x 10 ⁴
Bumbacul	5 – 7	0,3 – 0,7	5 – 15 x 10 ³
Oțelul	8	2,0	2 x 10 ³

Rezistența mătăsii naturale scade cu până la 30% în urma îndepărtării sericinei, iar în stare umedă rezistența este mai mică cu 10–15%.

Rezistența mare la rupere a mătăsii naturale se poate explica pe seama împachetării strânse a microfibrilelor ce formează structura sa morfologică, cât și datorită gradului său înalt de cristalinitate.

Rezistența la temperatură a mătăsii naturale este mai mare decât a lânii. Mătasea naturală încălzită până la 80°C capătă o rezistență mecanică mai mare, între 110–130°C rezistența mecanică scade foarte mult datorită creșterii plasticității sale, iar peste 160°C începe să se topească. Introdusă în flacără, mătasea se topește, apoi arde răspândind un miros de corn ars, ca și lâna, și în aceleași timp se formează o măciulie sfărâmicioasă ca în cazul tuturor fibrelor de natură animală.

Alungirea la rupere a fibrei de mătase naturală este mai mică decât a lânii. Astfel, în stare uscată, este de 20–25 %, iar în stare umedă, ajunge până la 30%.

Elasticitatea este proprietatea unor corpuri solide de a se deforma sub acțiunea forțelor exterioare și de a reveni la forma inițială, imediat după dispariția cauzelor care au produs deformarea. Această proprietate se exprimă numeric

prin modulul de elasticitate, E . Acest modul se definește ca fiind raportul dintre efortul unitar normal σ și deformația apărută (în cazul mătăsii alungirea relativă ε) și este dat de relația:

$$E = \sigma / \varepsilon$$

unde:

$\sigma = F / S_0$; $\varepsilon = \Delta l / l_0$; F = forța ce produce deformarea; S_0 = secțiunea inițială a corpului supus deformării; l_0 = lungimea inițială a corpului supus deformării; Δl = diferența față de l_0 apărută la deformare.

Mătasea naturală poate fi deformată prin întindere până la 20% fără să se rupă, dar, pentru a reveni la dimensiunea inițială, această întindere nu trebuie să depășească 2% din lungimea sa inițială. Modulul de elasticitate a fibrei de mătase este de 700–800 daN/mm².

Mătasea naturală are cel mai mare modul de elasticitate din rândul fibrelor textile naturale și o bună capacitate de revenire elastică.

16.5. PROPRIETĂȚILE FIZICE ALE MĂTĂSII

Culoarea mătăsii degomate este albă și are un luciu deosebit indiferent de viermele de mătase care a produs-o.

Mătasea nedegomată are culoare gălbuie, galbenă, gri, maro, roșcată sau verzuie. Aceste nuanțe se datorează prezenței unor coloranți sau pigmenți organici care fac parte din seria carotinelor, xantofilei sau flavonelor, se găsesc în sericină, iar prezența lor depinde de specia viermelui de mătase și de sursa sa de hrană [34].

Lungimea filamentului de mătase naturală depinde de specia viermelui producător, de mărimea gogoșilor și este de 300–1500 m sau mai mult.

Finețea mătăsii naturale este dependentă de diametrul firului bifilamentar. Acest diametru este variabil: 20–30 μ m pentru firul din partea exterioară a pereților gogoșilor, de 30–40 μ m în partea de mijloc și de 17–25 μ m pentru partea interioară.

Densitatea mătăsii naturale degomate este mai mică decât a bumbacului, lânii sau a inului și are valori de 1,3–1,32 g/cm³. Mătasea nedegomată este ceva mai densă (1,32–1,37 g/cm³).

Mătasea naturală este un material higroscopic, putând adsorbi până la 30% umiditate. Este mai puțin higroscopică decât bumbacul și mai higroscopică decât lâna. Fibra de mătase naturală se umflă în urma pătrunderii apei și se scurtează cu până la 20%. Pe baza aceluiași procese studiate la capitolul care tratează despre collagen (cap.12), umflarea mătăsii naturale se accentuează în soluții acide sau alcaline (vezi umflarea osmotică).

Mătasea naturală este insolubilă în apă și în solvenți organici (benzen, alcool etilic, alcool metilic, eter sulfuric, sulfură de carbon, acetonă). Fibroina se dizolvă în soluții amoniacale de oxid de cupru sau nichel, în soluție alcalină cupro-glicerinică, în soluții de hidroxid de cupru, precum și în unii acizi tari: acid fosforic, sulfuric, clorhidric, dicloracetic și acid formic, în soluții concentrate și la temperatura camerei. De asemenea, mătasea se dizolvă în soluție de 5% hidroxid de sodiu sau tiocianat de sodiu 70%, la fierbere.

Mătăsurile au lustru, au un răspuns specific electromagnetic și o anumită particularitate la razele UV [7].

16.6. PROPRIETĂȚI CHIMICE ALE MĂTĂSII

Mătasea își pierde din rezistență după lungi perioade de timp, dar, în special, la expunerea prelungită la razele solare. În mediu uscat, la frecare, mătasea se încarcă electrostatic.

Fibroina, în comparație cu alte proteine fibroase (colagenul, elastina), are un număr redus de grupe reactive capabile de a adsorbi apa datorită compoziției sale în aminoacizi (Fig.16.11.) [13, 20]. Se constată că fibroina are o adsorbție de apă apropiată de aceea a nylon-ului, dar mult mai mică decât a colagenului.

Ca toate proteinele, fibroina are grupe reactive libere cu caracter acid și cu caracter bazic. Procentul grupelor acide este mai mare decât al celor bazice și, din acest motiv, pH_i al fibroinei are valori de 3,5–3,9.

Datorită caracterului sau amfoter, mătasea naturală se poate vopsi cu coloranți bazici sau acizi. Coloranții bazici reacționează mai intens decât coloranții acizi datorită numărului mai mare de grupe carboxilice libere din fibroină.

Hidroliza fibroinei. Fibroina hidrolizează în apă la temperatură ridicată sau în soluții apoase alcaline sau acide și sub influența temperaturii sau pe cale enzimatică. În mediu apos, hidroliza fibroinei decurge lent la valori de pH = 4–8. Hidroliza alcalină a fibroinei se produce cu mai mare intensitate decât asupra keratinei. Gradul de hidroliză a fibroinei se intensifică, cu creșterea valorilor de pH peste 10 și cu mărirea temperaturii.

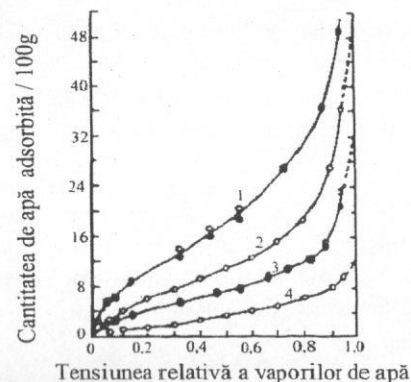


Fig. 16.11. Curbele adsorbției de apă ale: 1. colagenului; 2. albuminei din ou; 3. mătăsii (*Bombyx mori*); 4. nylonului (poliamidă obținută prin condensarea diaminelor cu acizii dicarboxilici).

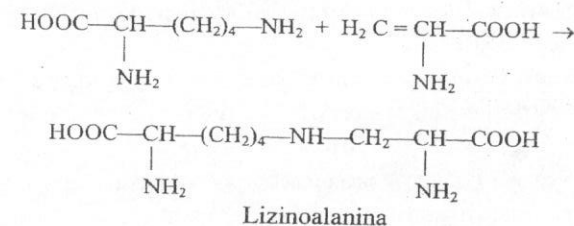
Degradarea fibroinei la temperaturi joase este puțin pronunțată chiar în soluții de hidroxid de sodiu. Într-o soluție de 5–7% hidroxid de sodiu, la temperatura de fierbere, mătasea se descompune în câteva minute. Cu soluții de 0,01–0,1N hidroxid de sodiu, prin încălzire, se produc degradări slabe, dar observabile. Mătasea este puțin atacată de soluții de fosfat de sodiu, carbonat de sodiu, silicat de sodiu, pirofosfat de sodiu. Hidroxidul de amoniu afectează foarte puțin fibroina. Soluțiile diluate de acizi tari, prin încălzire, nu produc degradări vizibile. Fibroina este mai rezistentă la acțiunea acizilor slabi minerali sau organici ca: fosforic, sulfuros, acetic, oxalic.

În aceste medii acide are loc o umflare moderată a fibroinei și o hidroliză foarte redusă.

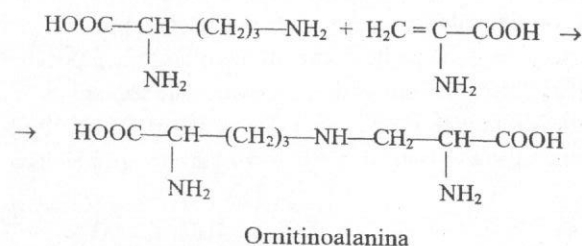
Fibroina are rezistență relativ ridicată la acțiunea enzimelor proteolitice. Hidroliza enzimatică a fibroinei poate fi intensificată dacă se efectuează, în prealabil, o afânare pe cale chimică sau o degradare mecanică.

Acțiunea alcaliilor asupra fibroinei. Soluțiile alcaline concentrate produc hidroliza fibroinei, care este mai pronunțată la temperaturi ridicate.

Din hidrolizatele de fibroină s-a izolat un compus N^e-(2-amino-2-carboxi-etil)lizina (lizinoalanină). Lizinoalanina ia naștere din dehidroalanină, care se formează din serină prin eliminarea unei molecule de apă și o lizină:

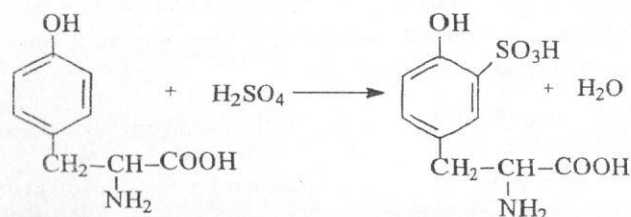


La fel se formează ornitinoalanina dintr-un rest de dehidroalanină și un rest de ornitină:



Ornitina nu a fost identificată în fibroină, dar aceasta este un produs de degradare a argininei care se găsește în fibroină.

Acțiunea acizilor asupra fibroinei. Pe lângă acțiunea hidrolitică asupra fibroinei, acidul sulfuric concentrat, la cald, în timp mai îndelungat, determină și sulfonarea nucleului aromatic al tirozinei prezentă în fibroină [34]:



Nu sunt excluse nici posibilitățile de reacție dintre grupele aminice sau hidroxilice libere și acidul sulfuric, formându-se acizi sulfaminici, respectiv esteri sulfurici ai serinei și treoninei [33].

Acidul azotic degradează fibroina prin scindarea legăturilor peptidice și, de asemenea, determină reacții de substituție electrofilă asupra nucleelor aromatice formând derivați nitrici.

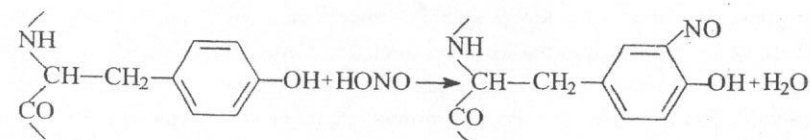
La tratarea fibroinei cu acid azotic concentrat se produce îngălbenirea sa (reacția xantoproteică), colorația aceasta putând fi îndepărtată prin tratarea, la fierbere, cu o soluție de clorură stanoasă, când se produce reducerea grupărilor nitrice.

La tratarea cu acid azotic are loc nitrarea nucleelor aromatice ale fenilalaninei și tirozinei rezultând nitrofibroina, care poate fi diazotată prin tratarea cu acid azotos. Diazofibroina rezultată poate fi cuplată cu diferite componente de cuplare rezultând colorări diverse în funcție de componenta de cuplare [34].

Acidul azotos produce dezaminări ale fibroinei. Se formează, în primă instanță, grupări de diazoniu care sunt instabile, iar în locul lor apar grupe hidroxilice:



La această reacție participă grupele aminice terminale ale lanțurilor polipeptidice și grupele aminice libere ale resturilor de lizină. Concomitent cu reacția de dezaminare, acidul azotos nitrează nucleul aromatic al tirozinei:



Acidul clorhidric la concentrația de 28,6% determină contracția filamentelor de mătase cu circa 30%. Dacă mătasea este clătită imediat după acest tratament nu se produce degradarea chimică a fibroinei.

În soluții diluate și la temperatura camerei, acizii organici nu degradează fibroina. În soluții concentrate pot determina dizolvarea mătăsii și degradarea ei (acidul formic, acidul acetic).

Oxidarea fibroinei. Acțiunea de oxidare a fibroinei poate avea loc la resturile laterale ale lanțurilor polipeptidice, la grupele aminice terminale și asupra legăturilor peptidice. În industria textilă, albirea fibroinei se face cu apă oxigenată care, în condiții normale, nu afectează puternic mătasea. Poate avea loc scăderea conținutului de tirozină.

Soluțiile de clor și de hipoclorit, chiar în concentrații mici, atacă fibroina. Este posibil să se formeze acizi cloraminici, acizi cetonici și cloramine. Acidul peracetic scindează mai rapid catenele polipeptidice ale fibroinei și este mai eficient în modificarea resturilor de tirozină în comparație cu apa oxigenată.

Mătasea, comparativ cu alte fibre textile, are o rezistență scăzută la oxidarea fotochimică, mai ales când oxigenul atmosferic este scindat homolitic de către razele luminoase. Rezistența maximă la fotooxidare este la pH=10 iar rezistența minimă este la pH=1-2 și la pH=13. Sărurile de fier, cupru, staniu, plumb catalizează fotooxidarea fibroinei.

Lumina solară îngălbeneste fibroina și la o expunere mai îndelungată îi micșorează rezistența mecanică, probabil datorită degradării tirozinei.

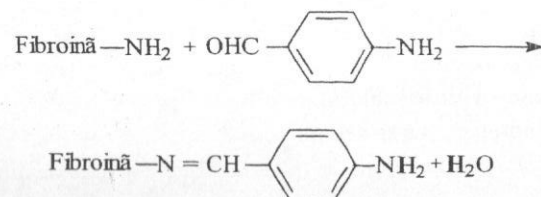
Tiourea, tiocianatul de amoniu, acidul tanic, formații, împiedică procesul de fotooxidare a mătăsii naturale.

Fibroina este rezistentă la acțiunea agenților *reducători* (hiposulfitul de sodiu, acidul sulfuros și sărurile sale, dioxidul de sulf etc.), care se folosesc frecvent în tehnologiile de prelucrare din industria textilă.

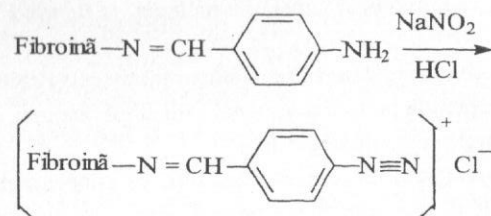
Diazotarea indirectă a mătăsii naturale. Grupele aminice libere de la lizină și arginină, grupele peptidice, grupele hidroxilice de la serină, tirozină și treonină ale fibroinei pot participa la reacțiile cu aldehydele. Sunt cunoscute reacțiile aldehydei formice, ale aldehydei glutarice care au importanță practică deosebită în cazul collagenului și keratinei.

Ținând cont de multiplele posibilități de reacție ale fibroinei cu gruparea aldehydică, p-aminobenzaldehida se poate grefa pe macromolecula acesteia și astfel apar noi grupe aminice primare legate de nucleul aromatic, care pot fi ușor diazotate și apoi, prin tratare cu diferite componente de cuplare, să formeze coloranți azoici.

Deci, prin grefarea fibroinei cu p-aminobenzaldehida apare posibilitatea diazotării indirecte a mătăsii naturale:

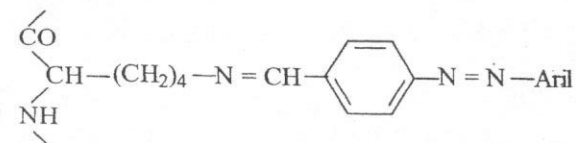


Prin diazotare se vor forma săruri de diazoniu grefate pe macromolecula de fibroină:



Macromolecula de fibroină se transformă într-un macrocation de diazoniu, care este un reactant electofil. Acesta va ataca nucleeele aromatice ale diferitelor componente de cuplare, determinând substituții electrofile și, în consecință, vor apărea coloranți azoici grefați pe fibroină.

Considerând că reacția p-aminobenzaldehidei are loc la grupa ε-aminică de la lizină va rezulta un colorant cu următoarea structură chimică:



Asupra fibroinei s-au efectuat cercetări privind obținerea de polimeri grefați prin mecanism radicalic. S-au folosit, mai ales, monomeri vinilici. Pentru grafarea mătăsii cu nitril acrilic, stiren și metacrilat de metil reacția de polimerizare a fost inițiată cu radiații γ.

S-a studiat grefarea monomerului nitril acrilic în fază de vapori pe fibra de mătase. Țesătura de mătase a fost imersată într-o soluție apoasă de persulfat de amoniu, timp de 30–60 minute, apoi proba stoarsă a fost introdusă într-un recipient care s-a vidat și apoi s-a umplut cu vapori de nitril acrilic. Monomerul s-a grefat ușor pe fibră.

Adaosul unei mici cantități de agent activ de suprafață neionic a dus la o creștere remarcabilă a cantității de produs grefat. Gradul de grefare depinde semnificativ și de concentrația inițiatorului.

16.7. SERICINA

Sericina, care înfășoară cele două filamente de fibroină, reprezintă până la 30% din conținutul fibrei de mătase. Cantitatea de sericină variază între 17–28%, mai ales în funcție de specia viermelui de mătase, de condițiile de cultură. Sericina este de natură proteică, însoțește fibroina la formarea firului de mătase, dar se deosebește de aceasta prin compoziția în aminoacizi, structura și proprietățile sale (Tabelul 16.4.) [14, 34].

Aminoacizii apolari cu rest lateral mic ca: glicina, alanina, leucina se găsesc în sericină într-o cantitate mult mai mică decât în fibroină, în timp ce aminoacizii polari, cum sunt: serina, acidul asparagic, acidul glutamic, lizina, arginina, treonina se găsesc într-o cantitate mult mai mare. De asemenea, seri-

cina conține asparagină și glutamină.

Tabelel 16.4.

Compoziția în aminoacizi ai fibroinei și sericinei din firul de mătase "Bombyx mori" (numărul de aminoacizi raportați la 1000 aminoacizi).

Aminoacidul	Fibroina	Sericina
Glicină	445	147
Alanină	293	43
Leucină	5	14
Izoleucină	7	7
Valină	22	36
Fenilalanină	6	3
Serină	121	373
Treonină	9	87
Tirozină	52	26
Acid asparagic	13	148
Acid glutamic	10	34
Arginină	5	36
Lizină	3	24
Prolină	3	7
Histidină	2	12
Triptofan	2	1
Cistină	2	5
Metionină	1	—
Asparagină și glutamină	—	86

Prezența în sericină a unei însemnate cantități de aminoacizi cu grupe polare face ca aceasta să fie solubilă în apă fierbinte și în soluții diluate de acizi și alcalii. La temperaturi de până la 80°–90°C, sericina se umflă în apă, iar peste 90°C, începe să se dizolve și procesul de dizolvare se accentuează până la temperaturi de 100°–110°C.

În soluții acide și, mai ales, alcaline (pH = 9,5–10) are loc o dizolvare mai rapidă la temperatura de 95°–100°C.

Din soluțiile apoase, sericina poate fi precipitată cu alcool etilic, iar precipitatul format după separare poate fi din nou dizolvat în apă.

Sericina din soluțiile apoase poate fi precipitată ireversibil cu taninuri vegetale sau sintetice, săruri bazice de crom, aldehide, acetat de plumb, clorură stanoasă etc. Întrucât sericina are $pH_i=3,9-4,3$, se dizolvă în soluții acide sub său pH_i , dar este mult mai solubilă în soluții alcaline.

Din soluțiile apoase de sericină s-au separat două fracțiuni: sericina A și sericina B. Sericina A rezultă prin precipitarea soluției de sericină cu sulfat de amoniu (15g sulfat de amoniu la 100 ml soluție de sericină), iar sericina B rezultă prin tratarea filtratului cu sulfat de amoniu.

Este posibil ca sericina să fie o substanță unitară și fracționarea ei să fie cauzată de intensitatea tratamentelor de solubilizare, când se poate produce fracționarea prin hidroliză a sericinei. Este, de asemenea, posibil ca sericina să fie constituită din filamente cu mase moleculare diferite, iar la solubilizare, să nu aibă loc fenomene de hidroliză asupra sericinei.

Sericina se descompune la temperatura de 180–190°C cu degajare de dioxid de carbon.

16.8. PRODUCȚIA DE MĂTASE

Așa cum s-a arătat în capitolul 16.1., mătasea naturală de *Bombyx mori* se obține prin sericicultură.

Cantități însemnate și constante de mătase, atât cantitativ cât și calitativ, se obțin însă prin procedee recombinante, *Escherichia coli* fiind cea mai utilizată soluție gazdă pentru producția de astfel de proteine.

Firele de mătase naturală se obțin din coconi, după ce pupele sunt suprimate prin tratare cu aer cald (95°C) sau cu abur supraîncălzit. Coconii sunt apoi uscați și selectați după mărime și culoare.

Urmează degomarea. Prin acest trament sunt îndepărtate sericina și celelate substanțe organice (pigmenți naturali și ceruri) care învâluie filamentele de fibroină.

Există multe procedee de degomare, care folosesc diverse combinații chimice: degomarea cu o singură baie, degomarea cu două băi, degomarea cu spu-

mă, degomarea enzimatică, degomarea cu amine alifatică [34].

Procesul poate fi accelerat prin ultrasonare.

Câte 50-60 de coconi, dintr-o partidă, sunt introduși în bazine cu apă, slab alcalină, aflată la fierbere. Coconii, astfel preparați, sunt trecuți în băi cu apă la 40°C, când dizolvarea sericinei și deslipirea firelor vor fi complete și firele de mătăsă pot fi depănate. În unele procedee de degomare se utilizează enzime ca tripsina. Degomarea rapidă are loc la tratarea cu soluții fierbinți de săpun 15-20% și sodă caustică.

Inițial, soluția folosită pentru degomare provoacă o degradare hidrolitică superficială a sericinei, rezultând peptide și aminoacizi. Viteza de reacție depinde de valoare de pH. Are valori mari la $\text{pH} \leq 2,5$ și la $\text{pH} \geq 9$. Operația de degomare se poate repeta în funcție de tipul de mătase care se urmărește a se obține (ecru, suplă, cuit) [34].

Se înregistrează o pierdere în greutate a mătăsii nedegomate de până la 28-30%.

Dacă mătasea cuit nu urmează să fie albită și vopsită, se tratează, în continuare, cu o soluție de acid acetic 1g/l, la 50-60°C, timp de 20 de minute, apoi se stoarce prin centrifugare [34].

În funcție de specia viermelui, un cocon poate conține 1000-3000m de fir, din care doar circa 50% poate fi valorificat după depănare.

Firele de mătăsă artificială, cu diametre micrometrice, pot fi obținute prin filare din soluție. Acest procedeu presupune extruderea unei soluții concentrate de mătase și trecerea, prin imersie, a firelor prin băi de coagulare, care pot conține alcool etilic, metilic sau soluții apoase de fosfat de potasiu. Post-coagulare, pentru a crește rezistența la tracțiune a firelor, acestea sunt etirate, când microcristalele β -plisate se aliniază, paralel cu axa firului, aproape la fel ca în structurile naturale.

Tragere în fire se poate executa și manual fructificându-se tendința fibroinei de a se orienta și auto asambla la interfața apă-aer.

Pentru obținerea de fibre nanometrice poate fi folosit procedeu de electrofilare, când se obțin straturi dezordonate de nanofibre.

16.9. UTILIZĂRILE MĂTĂSII

Fibrele de mătase s-au folosit în textile de mii de ani datorită proprietăților lor referitoare la aspect, tușeu și durabilitate.

Mătasea, s-a utilizat până la mijlocul secolului al XIX-lea și pentru unele instrumente optice, pentru că firul are diametrul mic, este rezistent la tracțiune și la temperatură.

S-au studiat și propus fibre de mătase hibrid, care conțin fibre sintetice cu miez de mătase, coextruse sau grefate. S-au realizat produse cosmetice (șampoane, creme, emulsii, pudre [33].

16.9.1. APLICAȚII BIOMEDICALE ALE MĂTĂSII

În ultimele decenii, mătasea de *Bombyx mori* a fost studiată pentru a fi utilizată ca biomaterial.

Mătasea de *Bombyx mori* a fost utilizată, mai întâi, alături de Catgut, ca fire de sutură și apoi în multe alte aplicații biomédicale. Răspunsul gazdei față de acest biomaterial a ridicat inițial întrebări privind biocompatibilitatea.

S-a constatat că sericina este cauza unor probleme legate de biocompatibilitate și de hipersensibilitate. Astfel, 90% dintre persoanele asmactice testate au fost alergice la extractul de mătase.

Odată îndepărtată sericina, fibrele de fibroină prezintă biocompatibilitate comparabilă cu a celorlalte biomateriale (Tabelul 16.5.)

În pofida utilizării lor de timp îndelungat, ca fire de sutură, fibrele de mătase au fost astăzi „redescoperite” și reconsiderate ca potențiale biomateriale utile într-o gamă de aplicații medicale și ca țesături-suport pentru ingineria tisulară.

Firele de sutură trebuie să prezinte o serie de caracteristici pentru a fi utilizate în aplicații specifice: rezistență la tracțiune adecvată; rezistența la înnodare fără alunecare; elasticitate pentru a se adapta la geometria segmentului care se coase; memoria formei cu diminuarea rigidității în timp; biodegradabilitate controlată; absența toxicității sau a iritabilității; posibilitatea alegerii firelor mono sau multifilamentare, după caz.

Mătasea de *Bombyx mori*, desericinată, constituie un fir de sutură frecvent

folosit în chirurgia oculară, neurală, cardiovasculară, estetică, dar și pentru alte țesuturi ale organismului. Rezistă bine la legare, la noduri și prezintă caracteristicile dorite de mulare pe țesuturile moi.

Tabelul 16.5.

Materiale de sutură care pot da reacții după implantare

Materiale de sutură	Model/loc de implementare	Bioresorbabil	Răspunsul gazdei %
Vicryl TM	șobolan	—	8,70
Catgut TM	cav.abdominală	Da < 60 zile	9,48
PGA sare	—	Da < 60 zile	11,25
Mătase împletită	—	Da < 60 zile	14,20
Titan	—	Nu	15,80
Teflon TM	iepure / subcutan	Nu	Slab
Prolene TM	—	Nu	Slab
Surgilene TM	—	Nu	Slab
PDS TM	—	Da < 60 zile	Moderat
Vicryl TM	—	Da < 60 zile	Moderat
Mătase împletită	—	Da < 60 zile	Moderat
Nylon	—	Nu	Moderat
Ethibond TM	—	Nu	Moderat
Mersiline TM	—	Nu	Moderat
Tevdek TM	—	Nu	Moderat
Catgut TM cromat	—	Da < 60 zile	Considerabil

După implantare, are proprietăți trombogenice, ceea ce face să se prefere suturile și țesăturile suport de mătase în intervențiile pe vasele de sânge.

Mătasea fiind de natură proteică, este susceptibilă degradării proteolitice și, de aceea, după perioade lungi de timp de la implantare, este absorbită lent de către organismul gazdă. Se apreciază că firele de mătase își pierd aproape total rezistența la tracțiune într-un an de la implantare și nu se mai pot evidenția *in vivo* după 2 ani de la implantare [26].

Studii *in vitro* au arătat că proteaze, de tipul chimotripsinei, segmentează

lanțul proteic în dreptul regiunilor amorfe, rezultând peptide ce apoi pot fi metabolizate la nivel de celulă. Din acest motiv, viermele de mătase produce un inhibitor de proteaze cu care învelește firul secretat de glande, tocmai pentru a proteja coconul de proteolize premature.

Apariția ingineriei tisulare a mărit cererea de biomateriale suport al dezvoltării tisulare *in vitro* înainte de implantarea la pacient.

Biomaterialul care alcătuiește matricea suport joacă un rol cheie în găzduirea celulelor, în intermedierea și traducerea „comunicațiilor” dintre aceste celule și mediul biologic al organismului gazdă și, invers, conducând la desăvârșirea dezvoltării țesutului *in vivo*.

Suportul celular sau matricea trebuie să permită atașarea celulară, răspândirea, creșterea și diferențierea celulelor, biointegrarea ansamblului, rezultând, în final, un țesut viabil și funcțional biologic. În cele mai multe cazuri, este dorit ca matricea să poată fi biodegradată, în timp, în fragmente sau monomeri metabolizabili de către celulele gazdei [47].

Din aceste considerente fibroina din mătase prezintă versatilitate în utilizările biomedicale putând constitui matricea de bază în dezvoltarea unor țesuturi ca cel osos, ligamente, tendoane, cartilaje și vase de sânge.

Fibroina din mătase poate fi prelucrată în fibre, rețele, plase, spume, filme, bureți, hidrogeluri (Tabelul 16.6.) [27, 28, 31, 34, 42, 43, 66, 69, 67,70].

Filmele de fibroină se obțin prin turnarea de soluții concentrate pe suporturi plani. În urma evaporării solventului, se obțin filmele care se separă apoi de suport. Din soluții apoase de fibroină rezultă filme (mătase de tip I) cu rezistențe mici la tracțiune, pentru că proteinele formează structuri dezordonate cu un conținut însemnat de lanțuri α -helicoidale. Aceste filme pot fi reticulate, pentru a li se mări rezistența la tracțiune (mătase de tip II), prin tratare cu alcool metilic, coacere la temperaturi ridicate, iradiere UV, când au loc schimbări conformaționale care îmbunătățesc stabilitatea mecanică a structurilor [49].

Creșterea celulară pe filme de fibroină este asemănătoare cu aceea pe filme colagenice de tip I, ambele oferind numeroase posibilități de interacțiune fizico-chimică între celule și grupele reactive din catenele laterale ale lanțurilor biopolimerice.

Tabelul 16.6.

Exemple de utilizare a fibroinei din mătase ca matrice în ingineria tisulară

Tipul de produs	Tipul de celule suport „in vitro”	Observații
Fibroină film	Fibroblaste de la șoarece	Creștere similară cu aceea de pe filmele colagenice (col. tip I)
Fibroină film	Celule carcinoame umane din colon, plămâni și din mucoasa bucală	Creștere similară cu aceea de pe filmele colagenice (col. tip I)
Fibroină film	Osteoblaste umane	Formarea osului este evidentă
Fibroină film	Celule stem umane	Dezvoltarea de certe formațiuni osoase
Fibroină film	Fibroblaste umane din ligament încrucișat anterior	Dezvoltarea de ligamente „in vitro”

Datorită caracteristicilor mecanice superioare, suporturile de fibroină sunt dorite atât ca filme, cât și ca fibre în substituenții osoși viabili. Structurile filamentare fibroinice, mono și polifilamentare sau împletite, constituie suporturi celulare rezistente la solicitări mecanice destinate creșterii fibroblastelor în scopul obținerii de substituenți de ligamente și de tendoane.

S-au produs la scară pilot matrici fibroase împletite din mătase, care se pot utiliza într-o serie de scopuri medicale pentru: tendoane artificiale, repararea oaselor și a țesuturilor.

Fibroina de mătase cu structură poroasă, în prealabil purificată, este biocompatibilă și aplicabilă ca structuri în ingineria tisulară [39, 40].

O cale de obținere a fibroinei poroase este liofilizarea unei soluții apoase de fibroină, care conține mici cantități de solvent organic. Concentrația solventului și a fibroinei determină porozitatea structurii și proprietățile mecanice. Ca solvent organic se poate folosi metanolul, iar alături de fibroină se poate adăuga

gelatină. Fibroina de mătase suferă o schimbare conformațională de la spirale întâmplătoare la foi pliate β [41].

Soluțiile concentrate de fibroină pot gelifica spontan, în timp de ore, biopolimerii tinzând la o stare de minimă energie, când se refac rețelele β -pliate native, odată cu înglobare în rețea a unor cantități de apă. Gelificarea este mult accelerată de apropierea de valoarea de pH_i . Timpul de gelificare poate fi redus prin ultrasonare. Hidrogelurile și-au găsit aplicații în sisteme de eliberare controlată a principiilor active [50].

Fibroina de mătase sulfată inhibă deficiența imunitară a unor virusuri *in vitro*. De exemplu, au activitate anti-HIV-1 *in vitro* [42].

Fibrele proteice de mătase pot fi folosite ca matrix de cultură tridimensională de celule în ingineria tisulară [45].

Bibliografie

1. Goldsmith M. R., Shimada T., Abe Hiroaki, Annu. Rev. Entomol., 50, 71-100, 2004.
2. Maekawa H., Takada N., Mikitani K., Ogura T., Miyajima N., Fujiwara H., Kobayashi M., Ninaki O., Chromosoma, 96, 263-269, 1988.
3. Yoshitake N., Journal of Sericological Science of Japan, 37, 83-87, 1968.
4. Kühn D., Chinese Sci., 12, 77-114, 1955.
5. Scoble M.J., *Lepidoptera, form, function and diversity*, Princeton Univ. Press, 1995.
6. Grimaldi and Engel, *Evolution of the Insects*, Cambridge University Press, 2005.
7. Livegood C.D., *Silk*, In *Polymers – Fibers and Textiles: A Compendium*, Kroschwitz J. I. Ed., New York; Wiley, 1990.
8. Robson R.M., *Silk composition, structure and properties*, Fiber Chemistry Handbook of Science and Technology, vol IV, Lewin M., Pearce E. eds., New York: Marcel Dekker, 1985.
9. Asakura T., Kaplan D.L., *Silk production and processing*, Encyclopedia of Agricultural Science, New York, Academic Press, 1995.

10. Kaplan D. L., Lombardi S.J., et al., In *Biomaterials: Novel Materials from Biological Sources*, Bxrom D. ed., New York, Stockolm, 1991.
11. Kaplan D.L., Fossey S., Viney C., Muller W., *Self-organisation (assembly) in biosynthesis of silk fibers - a hierarchical problem*, In Hierarchically Structured Materials, Aksay I.A., Baer E., Sarikaya M., Tirrell D.A. eds., Proc. Materials Res. Soc. Pittsburg, 1992.
12. Vincent J., *Structural biomaterials*, Princeton University Press, Princeton, New Jersey, 1991.
13. Chiriță M., *Biopolimeri și compozite naturale*, Ed.Tehnica-INFO, Chișinău, 2001.
14. Lucas F., Rudall K.M., *Extracellular fibrous proteins: the silks*, In Comparative Biochemistry (ed. M. Florkin, E.H. Stotz) 26 B, Elsevier, 1996.
15. Dickerson R.E., Geis., *Struktur und Function der Proteine*, Verlag Chemie -Weinheim, Bergstrasse, 1971.
16. Mc Grath K., Kaplan D.L., *Protein-Based Materials*, Mc Grath K., Kaplan D.L. editors, Birkhauser, Boston, Basel, Berlin, 1997.
17. Lombardi S.J., Kaplan D.L., *The Nephila clavipes*, J. Arachnol. 18, 279, 1990.
18. Lucas F., Rudall K.M., In Comprehensive Biochemistry: *Extracellular and Supporting Structures*, Florkin M., Stotz E.H. eds., Amsterdam, Elsevier, 1968.
19. Nenițescu C.D., *Chimie organică*, vol. II, Editura Didactică și Ped., București, 1980.
20. Neurath H., Kenneth B., *The Proteins*, Academic Press Inc. Publishers, New York, 1953.
21. Bernal J.D., Megaw H.D., Proc. Roy. Soc.(London), A 151, 394, 2003.
22. Mita K., Ichimura S., Zama M., James T.C., J.Mol.Biol., 203, 917, 1988.
23. Mita K., Ichimura S., James T.C., J. Mol. Evol. 38, 583, 1994.
24. Strydom D.J., Haylet T., Stead R.H., Biochem. Biophys. Res. Commun 79, 932, 1977.
25. Huemmerich D., Scheibel T. et al., Current Biology, 14, 2070-2074, 2004.
26. Cuniff P.M., Fossey S.A., et al., *Mechanical properties of major ampullate gland silk fibres extracted from Nephila clavipes spiders*, In Silk Polimers: Materials Science and Biotechnology, Kaplan D.L., Adams W.W., Farmer B., Viney C. eds. Washington D.C., American Chemical Society Symp. Series 544, 1994.
27. Cuniff P.M., Fossey S.A., et al., Poly. Adv. Technol., 5, 401, 1994.

28. Mahoney D.V., Vezie D.L., et al., In *Silk Polymers Materials Science and Biotechnology*, Kaplan D.L., Adams W.W., Farmer B., Viney C.eds., Washington D.C., American Chemical Society Symp. Series 544, 1994.
29. Pachter R., Crane R.L., Adams W.W., *Approaches to modeling and property predictions of model peptides*. In Silk Polymers: Materials Science and Biotechnology, Kaplan D.L., Adams W.W., Farmer B., Viney C. eds. Washington D.C., American Chemical Society Symp. Series 544, 1994.
30. Laible R.C., *Fibrous armor*. In Ballistic Materials and Penetration Mechanics, Laible R.C. ed. Amsterdam: Elsevier, 1997.
31. Magoshi J., Magoshi Y., J. Polym. Sci. Japan, 15, 1673, 1977.
32. Nakamura S., Magoshi J., Magoshi Y., *Thermal properties Science and Biotechnology*, Kaplan D.L., Adams W.W., Farmer B., Viney C. eds., Washington D.C., American Chemical Society Simp. Series 544, 1994.
33. Yoshimizu H., Asakura T., J. Appl. Poly Sci. 40, 127, 1990.
34. Ifrim S., *Mătasea naturală*, Editura Ceres, București, 1998.
35. Ethicon, Inc., *Wound closure manual*. The suture: specific suturing materials. Non-absorbable sutures. Somerville, NJ: Ethicon, Inc. 2000.
36. Inouye K., Kurokawa M., et al., J Biochem Biophys Meth; 37, 159-164, 1998.
37. Sofia S., McCart M.B., Kaplan DL. J Biomed Mater Res; 54:139-48, 2001.
38. Altman GH, Horan RL et al., Biomaterials; 23, 4131-41, 2002.
39. Kadolph S., J.Textiles. 10 th ed. Upper Saddle River: Pearson Prentice, 76 - 81, 2007.
40. Tamad Y., Biomacromolecules, 6 (6), 3100, 2005.
41. Gil E.S., Frankowski D.J., et al., Biomacromolecules, 7 (3), 728-735, 2006.
42. Gotoh K., Izumi H., et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 64 (8), 1664, 2000.
43. Asakura T., Ohgo K., et al., Biomacromolecules, 6 (1), 468-474, 2005.
44. Asakura T., Suita K., et al., Magn. Reson. Chem., 42 (2), p. 258-266, 2004.
45. Asakura T., Sugino R., et al., Biochemistry, 41 (13), p. 4415-4424., 2002.
46. Huang J.K., Li M. et al., *Silk protein fiber biomaterials and tissue engineering*, 18 (2), p. 127-130, 2004.
47. Altman G.H., Diay F., et al., Biomaterials, 24, p. 401-416, 2003.
48. Banani K., Kurland N.E. et al., *Silk proteins for biomedical applications: Bioengineering perspectives*, Progress in Polymer Science, 39, 251-267, 2014.
49. Scheibel T., Zahn H., Krasowski A., *Silk*, Ulmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vol.33, 2011.

50. M.Chiriță, *Sisteme de eliberare a substanțelor bioactive, Vol.I*, Ed.Tehno-press, 2004.
51. Banani K., Rajkhowa R. et al., *Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations*, Adv. Drug Delivery Reviews, 65, 457-470, 2013.
52. Rnjak-Kovacina J., Des T.M. et al., *The Effect of Sterilization on Silk Fibroin Biomaterial Properties*, Macromolecular Bioscience, 15, 6, 861-874, 2015.
53. Gang Li, Yi Li et al., *Silk-Based Biomaterials in Biomedical Textiles and Fiber-Based Implants*, Adv. Healthcare Materials, 4, 8, 1134-1151, 2015.
54. Lutz S., Bornscheuer I.U., *Silk Proteins – Biomaterials and Bioengineering*, Protein Engineering Handbook, 2011.
55. Lefevre T., Paquet-Mercier F. et al., *Structure of silk by raman spectro-microscopy: From the spinning glands to the fibers*, Biopolymers, 97, 6, 322-336, 2012.
56. Lei Yang, Zhaozhu Zheng et al., *Curcumin-functionalized Silk Biomaterials for Antiaging Utility*, J. of Colloid and Interface Science, 496, 66-77, 2017.
57. Scheibel T., Zahn H., *Silk*, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Online 2016.
58. Melke J., Midha S. et al., *Silk fibroin as biomaterial for bone tissue engineering*, Acta Biomaterialia, 31, 1-16, 2016.
59. Danyan Wang, Haifeng Liu, *Silk fibroin for vascular regeneration*, Microscopy Research & Technique, 80, 3, 280-290, 2017.
60. Wray L.S., Xiao Hu et al., *Effect of processing on silk-based biomaterials: Reproducibility and biocompatibility*, J. of Biomedical Materials Research, B, 99B, 1, 89-101, 2011.
61. Eileen S. Lintz E.S., Scheibel T.R., *Dragline, Egg Stalk and Byssus: A Comparison of Outstanding Protein Fibers and Their Potential for Developing New Materials*, Adv.Functional Materials, 23, 36, 4467-4482, 2013.
62. Babu K.M., *Silk from silkworms and spiders as high-performance fibers*, Structure and Properties of High-Performance Fibers, Woodhead Publishing Series in Textiles, 327-366, 2017.
63. Huang Y., Bailey K. et al., *Silk fibroin films for potential applications in controlled release*, Reactive and Functional Polymers, 116, 57-68, 2017.
64. Breslauer D.N., Kaplan D.L., *Silks*, Reference Module in Materials Science and Materials Engineering, 2016.
65. M. Wöltje M., Böbel M., *Natural biodegradable medical polymers: Silk*, Science and Principles of Biodegradable and Bioresorbable Medical Polymers, 351-376, 2017.

66. Abdel-Naby W., Lawrence B.D., *Processing of silk biomaterials*, Advances in Silk Science and Technology, 171-183, 2015.
67. Colomban P., Jauzein V., *Silk: Fibers, films, and composites—types, processing, structure, and mechanics*, Handbook of Properties of Textile and Technical Fibers, Second Ed., 137-183, 2018.
68. Delezuk J.A.M., Pavinatto A. et al., *Silk fibroin organization induced by chitosan in layer-by-layer films: Application as a matrix in a biosensor*, Carbohydrate Polymers, 155, 146-151, 2017.
69. Karthik T., Rathinamoorthy R., *Sustainable silk production*, Sustainable Fibres and Textiles, 135-170, 2017.
70. Nultsch K., Germershaus O., *Silk fibroin degumming affects scaffold structure and release of macromolecular drugs*, European J. Phar. Sciences, 106, 254-261, 2017.
71. Sparkes J., Holland C., *The rheological properties of native sericin*, Acta Biomaterialia, online 2018.
72. <https://twitter.com/hashtag/%D0%A1%D0%B5%D1%80%D0%B8%D1%86%D0%B8%D0%BD?src=hash>, 2018.

CAPITOLUL 17

MĂTASEA DE MARE

17.1.	Introducere	1293
17.2.	Structura mătăsii de mare	1295
	<i>Bibliografie</i>	1297

17.1. INTRODUCERE

Mătasea de mare este o țesătură extrem de fină care este alcătuită din filamente lungi secretate de glandă sericigenă aflată în picioarele moluștelor *Pinna bilis*.

Capitolele precedente au tratat asupra firelor de mătase produse de viermi păianjeni. Aceste fire au o constituție cu atât mai sofisticată cu cât mai mare este varietatea de scopuri de utilizare și solicitările mecanice la care sunt puse. Complexitatea crește de la mătasea de *Bombyx mori* la mătasea de păianjen, atât prin componența scleroproteică, cât și prin subtilitatea organizării.

Aceste specii au construit fibre și structuri rezistente, în special, în condiții estreme.

Un excelent sistem adeziv a fost observat la multe specii de scoici, care prind, în mediu acvatic, de orice suport, probând indiferență în fața uriașelor țepene marine care le lovesc în mod obișnuit. Structura *Byssus threads* este fo-

sită ca o clamă pentru atașarea de patul marin atât de divers.

Moluștele produc specific anumite filamente care sunt comparabile cu fibrele de Kevlar și cu fibrele de carbon, fiind de cinci ori mai tari și de șaisprezece ori mai elastice decât fibrele tendonului uman [1] (Fig.17.1.).

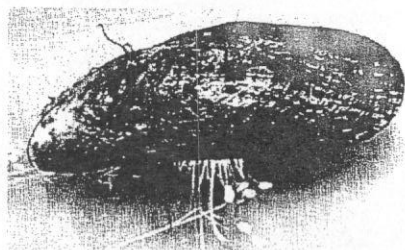


Fig.17.1. Fire de ancorare ale scoicilor

Mătasea de mare, provenită de la marele moluște bivalve *Pinna nobilis*, a fost produsă în regiunea mediteraneană până la începutul secolului XX.

Cochilia, care are o lungime de aproximativ un metru, se prinde solid de stree, cu un mănunchi (*Byssus*) consistent de fibre subțiri, foarte rezistente. Aceste filamente, individual de până la 6 cm lungime, sunt răsucite și atunci când sunt tratate cu suc de lamaie (acid citric), capătă o culoare auriu, permanentă [2]. De aici și numele de mătase de aur (Fig.17.2.).

Mătasea de aur sau lăna de aur se regăsește în documente antice din Grecia, Egipt, imperiul Roman (*lana pinna*), imperiul Bizantin, Arabia, China [7].

Pinna nobilis a devenit amenințată cu dispariția, din cauza pescuitului excesiv, a scăderii câmpurilor de vegetație marină dar și a poluării. De aceea a avut un impact dramatic și industria de mătase marină, astăzi fiind pe cale de dispariție.

Arta tradițională mai este acum păstrată doar de câteva femei de pe insula Ant'Antioco, lângă Sardinia [2]. Chiară Vigo a pretins că este singura persoană care trăiește astăzi și stăpânește arta de a lucra cu Byssus [4, 9].

S-a înființat Muzeul Mătăsii Mării din Sant'Antioco și, prin proiectul Sea-Ik, o expoziție de 60 de articole realizate din mătase de mare la Muzeul de Istorie Naturală din Basel [5].



Fig.17.2. Mătasea de *Aulacomya ater* [10].

17.2. STRUCTURA MĂTĂSII DE MARE

Piciorul moluștei este un dispozitiv ingenios care depistează suprafețele pe care le mai propice, le curăță, și apoi, doar în câteva minute, țese fire de prindere lizând proteine stocate în glandele specializate din structura sa anatomică.

Proteina în cauză este singura proteină fibrilară cunoscută, care prezintă segmente collagenice și segmente elastinice într-o aceeași structură terțiară, îndeplinind atât rol de rezistență la tracțiune cât și rol de absorbant de șocuri.

Cercetătorii au descoperit că moluștele absorb din mediul acvatic, la fel ca hrana, fier pe care îl folosesc apoi ca agent de reticulare al proteinelor fibrilare, crescând rezistența la tracțiune a firelor de ancorare.

Este prima dată când se dovedește că fierul este esențial în formarea unui material necristalin.

S-a stabilit că în compoziția firelor Byssus intră un bloc-copolimer de segmente proteice fibroase: collagen de două tipuri, elastină și lanțuri de tip fibronectină (Fig.17.3). Cele două tipuri de procologen, cu proprietăți specifice, au fost tratate cu PreCol-D (D = distal) și PreCol-P (P = proximal), iar odată formată structura cuaternară, ele se notează Col-D și Col-P (Fig.17.4.)

Fibrele nu sunt solidare între ele fiind căptușite cu un strat organic hidrofob (cuticulă) care protejează miezul proteic de acțiunea osmoliților din apă lină. Totodată cuticula acționează ca material antifricțiune prelungind durata viață a fibrelor, solicitate permanent, în mediul acvatic, la forțe mari de sucire-întindere.

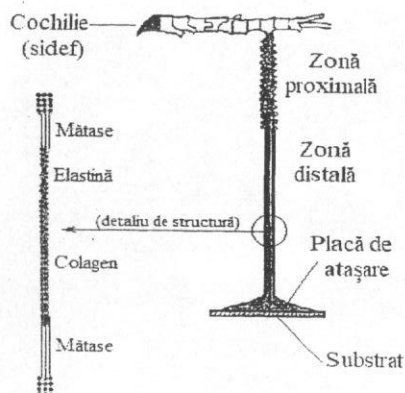


Fig.17.3. Representare schematică a structurii firelor Byssus
[după 12, modificată]

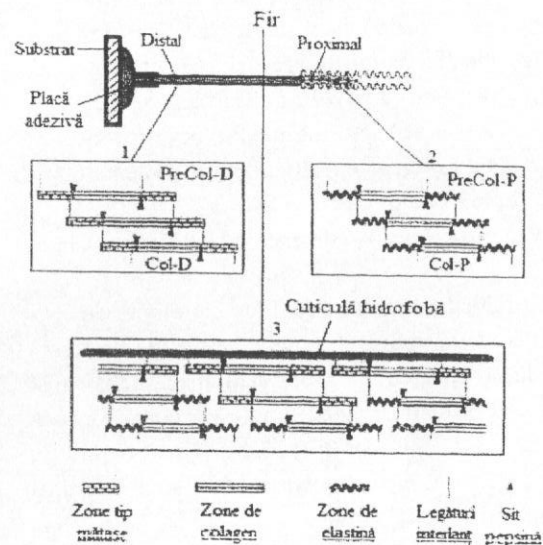


Fig.17.4. Representare a structurii firelor Byssus, cu zonele distincte:
 α -helicoidale, foi pliate β și elastinice amorse [după 12, modificată].

Placa adezivă, prin proprietățile sale specifice, dar mai ales prin versatilitatea de atașare la orice suport, a atras atenția oamenilor de știință. Combind caracteristicile importante ale celor doi adezivi, Gecko și proteinele din ele Byssus, noul material, cunoscut generic ca „geckel”, probează caracteristici puternice și reversibile de lipire/dezlipire, atât în mediu uscat cât și în mediu umed [31], ținând aplicații în medicină, știința materialelor, în proiecte litare.

Bibliografie

- Roach J., *Gecko, Mussel Powers Combined in New Sticky Adhesive*, National Geographic News, 18 iulie 2007.
https://en.wikipedia.org/wiki/Sea_silk, 5.03.2018.
 Paradiso M., Vigo C., *The last woman who makes sea silk*, BBC News 2 September 2015.
https://www.youtube.com/watch?v=TxE_AslyJxY, 5.03.2018.
<http://www.muschelseide.ch/en/projekt.html>, 5.03.2018.
http://network.icom.museum/fileadmin/user_upload/minisites/costume/pdf/Felicitas_Maeder_Toronto_article_PDF.pdf, 5.03.2018.
 Wipszycka E., *L'industrie textile dans l'Egypte romaine*, Wroclaw et al.: Komitet Nauk o Kulturze Antycznej Polskiej Akademii Nauk, 1965.
 Maeder F., *Byssus und Muschelseide – Ein sprachliches Problem und seine Folgen*, In *Weben und Gewebe in der Antike/Texts and Textiles in the Ancient World*, Ed. Harich-Schwarzbauer H., Oxford: Oxbow Books Ancient Textiles Series 23, 3-20, 2015.
 Lavazza S., *Dal buio alla luce – il bisso marino e Chiara Vigo*, Trevignano Romano RM: Cartabianca Publishing, 2012.
 Troncoso O.P., Torres F.G., *Characterization of the mechanical properties of tough biopolymer fibres from the mussel byssus of Aulacomya ater*, Acta Biomaterialis, 4, 4, 11140117, 2008.
 Anja Hagenau^a Periklis Papadopoulos, *Mussel collagen molecules with silk-like domains as load-bearing elements in distal byssal threads*, J. of Structural Biology, 175, 3, 339-347, 2011.
 Jan C.M. van Hest, Tirrell D.A., *Protein-based materials, toward a new level of structural control*, Chemical Communications, 19, 2001.
 Kurk F., McNamara C., *Better by design. An innovation Guide.*, Minnesota Pollution Control Agency, 2007.